

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**Corso di laurea in
Sicurezza Igienico-Sanitaria degli Alimenti**

***Salmonella* spp. nell'allevamento della gallina ovaioia**

Relatore: Dr. Mattia Cecchinato

Laureando: Pietro Barbacini

Anno accademico 2011/2012

INDICE

1. Introduzione	p.1
2. Caratteristiche microbiologiche del genere <i>Salmonella</i>	p.3
2.1. Caratteristiche biochimiche	p.3
2.2. Caratteristiche colturali	p.4
2.2.1. Ricerca di <i>Salmonella</i> spp. da matrici alimentari	p.5
2.2.2. Ricerca di <i>Salmonella</i> spp. da campioni clinici	p.8
2.3. Caratteristiche antigeniche	p.8
3. Classificazione e nomenclatura	p.11
3.1. Classificazione secondo Kauffmann-White	p.11
3.2. Classificazione secondo Le Minor	p.12
3.3. Tipizzazione sierologica	p.12
4. Epidemiologia delle infezioni da <i>Salmonella</i> spp.	p.15
4.1. Serbatoi animali	p.15
4.2. Vie di trasmissione	p.16
4.2.1. Alimenti	p.17
4.2.2. Ambiente	p.18
5. Infezioni da <i>Salmonella</i> spp. nell'uomo e negli animali	p.19
5.1. Meccanismo patogenico	p.19
5.2. Sintomatologia nell'uomo	p.20
5.2.1. Forma gastro-enterica	p.20
5.2.2. Forma sistemica	p.21
5.3. Sintomatologia negli animali	p.22

6. Misure di profilassi nell'allevamento avicolo **p.23**

- 6.1. Organizzazione della filiera p.23
- 6.2. Contaminazioni da agenti patogeni in fase di allevamento p.25
- 6.3. Misure igieniche in fase di allevamento p.28
- 6.4. Controlli sanitari nell'allevamento p.31

7. Diffusione di *Salmonella* spp. negli allevamenti avicoli **p.35**

- 7.1. Studio dell'EFSA su *Salmonella* spp. negli allevamenti di galline ovaiole Europei p.35
 - 7.1.1. Prevalenza di *Salmonella* spp. osservata nella Comunità Europea p.36
 - 7.1.2. Sierotipi e fattori associati alla positività p.37
 - 7.1.2.1. *S.Enteritidis* p.38
 - 7.1.2.2. *S.Typhimurium* p.41
- 7.2. Report EFSA: prevalenza di *Salmonella* spp. negli allevamenti di galline ovaiole dal 2004 al 2010 in UE p.42
 - 7.2.1. Analisi statistica dei trend di riscontro per *Salmonella* spp. anni 2004-2006 p.43
 - 7.2.2. Analisi statistica dei trend di riscontro per *Salmonella* spp. anni 2008-2010 p.44
 - 7.2.2.1. Obiettivi di riduzione p.46
- 7.3. *Salmonella* spp. negli allevamenti della gallina ovaiole extraeuropei p.47

8. *Salmonella* spp.: un problema di sanità pubblica **p.51**

- 8.1. *Salmonella* spp. nell'uomo: dati relativi all'Italia p.51
- 8.2. *Salmonella* spp. nell'uomo: dati relativi all'Europa p.55
- 8.3. *Salmonella* spp. nell'uomo: dati relativi ai Paesi extraeuropei p.58

9. Conclusioni **p.61**

10. Bibliografia **p.63**

1. Introduzione

La sicurezza alimentare è un bene inalienabile, irrinunciabile, che prescinde dalle qualità sensoriali del prodotto e dal costo economico sostenibile dal consumatore per soddisfare le proprie esigenze ed i propri desideri alimentari.

Ogni prodotto alimentare, qualunque sia la sua origine, la sua destinazione e il suo costo deve fornire totale garanzia di sicurezza cioè totale garanzia che può svolgere il suo compito di apportare nutrimento ed energia senza causare nessun tipo di danno al consumatore.

Salmonella spp. è il secondo microrganismo responsabile di malattie connesse al consumo di alimenti in Europa (EFSA, 2012). Tali microrganismi sono trasmessi principalmente dal consumo di acqua contaminata, nei paesi in via di sviluppo, o di alimenti di origine animale. La sua capacità di contaminare quasi tutti gli alimenti e le acque rende tale microrganismo estremamente pericoloso per la Salute Pubblica e di grande interesse per il cittadino. La connessione dell'infezione con il consumo di alimenti infatti ha favorito la nascita in tutto il mondo di misure di prevenzione atte al controllo, allo studio e alla raccolta di dati epidemiologici di *Salmonella* spp. Queste misure sono necessarie per ridurre i rischi connessi all'entrata di tale microrganismo negli allevamenti e di conseguenza all'assunzione di alimenti contaminati.

Pur non essendo una patologia con mortalità elevata, nei paesi sviluppati, *Salmonella* spp. è da considerarsi un problema di ordine Sanitario, di ordine Zootecnico e non ultimo un problema di costi legati ad una minore produzione animale e anche alle spese sanitarie che sono sostenute in seguito all'infezione. Negli Stati Uniti d'America il costo annuale stimato dei pazienti affetti da Salmonellosi che si rivolgono agli ospedali è di circa 177.792.568 milioni di dollari (Collier *et al.*, 2011).

L'obiettivo di questa tesi è quello di fornire una panoramica generale sulla diffusione di *Salmonella* spp. nel mondo ma in particolare in Italia e nell'Unione Europea, fornendo una valutazione generale sulla sua presenza e sui sierotipi più comuni negli allevamenti di galline ovaiole. Infatti le uova e gli ovoprodotti sono tra le maggiori fonti di infezione sostenute da *Salmonella* spp. nell'uomo. Verranno inoltre analizzate le misure intraprese a livello della Comunità Europea per ridurre la prevalenza negli allevamenti. I risultati relativi alle positività riscontrate negli anni sia negli animali che nell'uomo verranno analizzate per valutare l'efficacia delle misure di controllo messe in atto a partire dal 2006.

2. Caratteristiche microbiologiche del genere *Salmonella*

Il genere *Salmonella* fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, batteri bastoncellari, gram negativi, asporigeni, in generale mobili grazie alla presenza di flagelli, anche se vengono descritti sierotipi immobili (*S. Gallinarum* e *S. Pullorum*), aerobi-anaerobi facoltativi, catalasi positivi ed ossidasi negativi.

2.1. Caratteristiche biochimiche

All'interno della famiglia delle *Enterobacteriaceae* possiamo riconoscere numerosi altri generi, alcuni di essi: *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* alcuni di questi importanti per la Sanità Pubblica. L'identificazione di genere viene effettuata principalmente tramite l'utilizzo di test biochimici che permettono di identificare le differenze all'interno della famiglia. Questi test si basano nella maggior parte dei casi sulla capacità di utilizzare determinati substrati, di reagire in presenza di enzimi o di produrre metaboliti particolari.

Le informazioni così raccolte vengono comparate con dei risultati standard permettendo quindi la classificazione di genere. Nella tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche biochimiche dei microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Tabella 1. Caratteristiche biochimiche dei principali generi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Graziani *et al.*, 2005)

Principali caratteri differenziali	Genere								
	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i>
Mobilità	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Produzione di H ₂ S	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Voges-Proskauer	-	+	+	+	✓	-	-	-	-
Produzione di indolo	-	-	-	✓	✓	✓	+	+	-
β-galattosidasi	-	+	+	+	-	+	+	✓	+
Ureasi	-	+	-	✓	+	✓	-	-	✓
Lisina decarbossilasi	+	+	+	+	-	✓	✓	-	-
Fermentazione lattosio	-	+	+	✓	✓	✓	+	-	+
Fermentazione saccarosio	-	+	+	+	✓	✓	✓	-	✓

V variabile; + positivo; - negativo

Il profilo biochimico tipico di *Salmonella* spp. è illustrato in tabella 2, bisogna però ricordare che vi sono grandi differenze fra le diverse specie e sottospecie. Per questo l'identificazione di specie segue meccanismi più complessi, che verranno riportati nel capitolo 3.

Tabella 2. Caratteristiche biochimiche del genere *Salmonella* (Zavanella, 2001)

Reazione	Risultato	Reazione	Risultato
<i>Produzione di indolo</i>	-	<i>Idrolisi dell'urea</i>	-
<i>Rosso metile</i>	+	<i>Voges-Proskauer</i>	-
<i>Riduzione dei nitrati</i>	+	<i>Fermentazione del glucosio+gas</i>	+
<i>Produzione di H₂S</i>	+	<i>Fermentazione del lattosio</i>	-
<i>Fermentazione del saccarosio</i>	-	<i>Fermentazione di salicina</i>	-
<i>Fermentazione di adonite</i>	-	<i>Fermentazione di mannite</i>	+
<i>Fermentazione del maltosio</i>	+	<i>Fermentazione di inosite</i>	-
<i>Fermentazione del sorbite</i>	+	<i>Liquefazione della gelatina</i>	-
<i>Sviluppo con NH₄ citrato</i>	+	<i>Sviluppo con KCN</i>	-

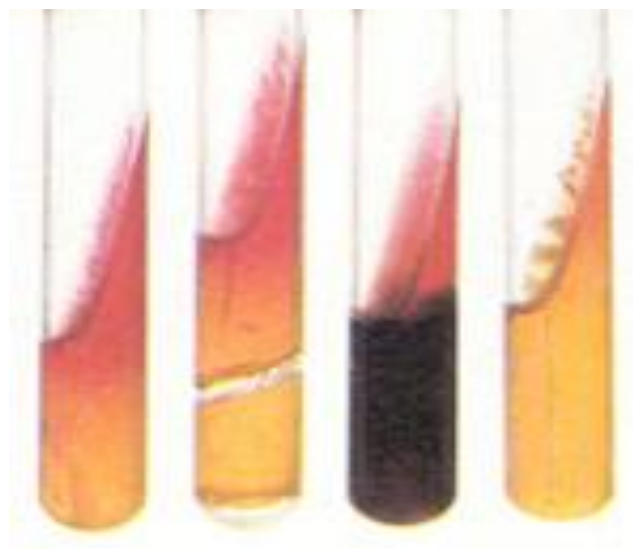
2.2. Caratteristiche culturali

Salmonella spp. cresce facilmente sui comuni terreni sintetici, sia liquidi che solidi. In terreni liquidi come Brodo nutritivo, o brodo *Brain Heart Infusion* (BHI), si sviluppa una torbidità uniforme dopo 18-24 ore d'incubazione a +37 °C. Su Agar sangue le colonie raggiungono dimensioni leggermente maggiori rispetto ai comuni terreni solidi e non presentano emolisi. In alcuni casi, si hanno *Salmonelle* a crescita lenta, con colonie del diametro di 0,5-1 mm, tendenti a rimanere tali anche dopo prolungata incubazione. Si tratta delle cosiddette colonie "nane", tipiche quasi esclusivamente delle *Salmonelle* ospite adattate più difficili da coltivare (tra cui *S.Choleraesuis*, *S.Abortusequi*, *S.Abortusovis*, *S.Gallinarum*, *S.Pullorum*). Colonie di dimensioni maggiori si possono

ottenere aggiungendo al terreno colturale sodio tiosolfato allo 0,1 % (metodo applicabile per le sub-culture in terreni non selettivi), oppure incubando per ulteriori 24 ore le piastre dei terreni di primo isolamento che mostrano microcolonie sospette. Sui terreni solidi selettivi e/o differenziali le colonie si presentano con diametro inferiore e colorazioni diverse. Trattandosi di terreni contenenti sostanze inibenti, dopo incubazione a +37 °C per 24 ore il numero di colonie formate diminuisce di un logaritmo rispetto a terreni non selettivi presi come paragone (BHI Agar).

In provette di Kligler Iron Agar, seminate per strisciamento e successiva infissione, *Salmonella* cresce in genere abbondantemente, mostrando uno “slant” alcalino in superficie, dovuto ad un attacco catabolico dei peptoni con produzione di ione ammonio e viraggio dell’indicatore rosso fenolo verso il rosso, ed un fondo acido (giallo), mascherato dalla formazione di solfuro di ferro nero (reazione H₂S positiva, visibile nella figura 1).

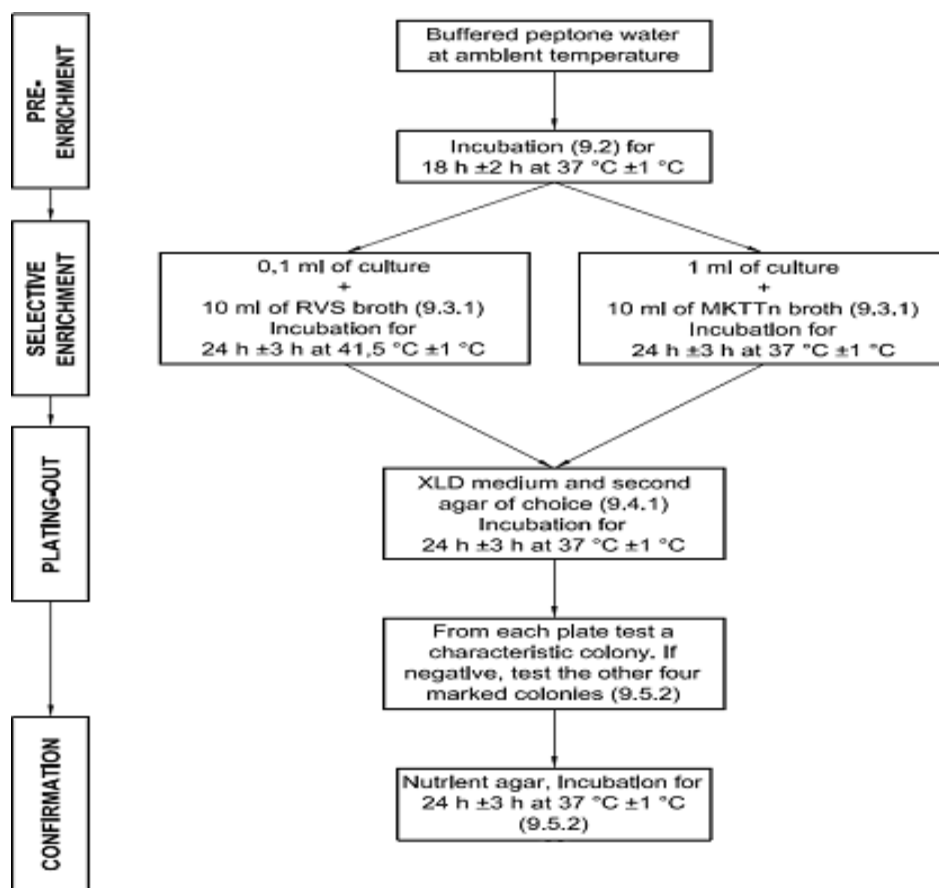
Figura 1. Test su Kligler Iron Agar per *Salmonella* spp. (www.unav.es/microbiol/englishversion/)



2.2.1 Ricerca di *Salmonella* spp. da matrici alimentari

L’isolamento di *Salmonella* spp. è un importantissimo strumento, utile per analizzare i campioni alimentari. Tuttavia sono presenti una gran quantità di metodologie e pratiche di laboratorio che vengono utilizzate, questo fatto crea dei problemi relativi alla riproducibilità delle stesse analisi e introduce possibili errori metodologici. Per questo motivo sono state introdotte delle metodiche denominate con il termine ISO, che si sono rivelate valide nell’isolare *Salmonella* spp. In particolare l’ISO 6579:2002, descrive le pratiche per la ricerca qualitativa del microrganismo: nei prodotti di origine animale, negli alimenti per l’alimentazione animale e per la ricerca ambientale.

Figura 2. Flow chart ISO 6579:2002 (Feldsine *et al.*, 2001)



L'analisi si basa su quattro passi principali che permettono una determinazione della presenza/assenza per *Salmonella* spp. La ricerca è molto sensibile ma allo stesso tempo precisa, infatti *Salmonella* spp. può essere presente in concentrazioni molto basse e associata ad altri microrganismi della famiglia delle *Enterobacteriaceae* ma viene comunque evidenziata.

Pre-arricchimento in terreni non selettivi

Il pre-arricchimento è una fase necessaria per “risvegliare” i microrganismi, che possono aver subito degli stress, dovuti a trattamenti precedenti della matrice alimentare. Il campione prelevato viene addizionato con acqua peptonata a temperatura ambiente e poi incubato per un ora a 37±1°C. Se la quantità di campione dovesse essere molto grande l'acqua peptonata viene precedentemente riscaldata e successivamente inoculata.

Arricchimento in terreno selettivo

La coltura ottenuta nella fase di pre-arricchimento viene separata in due aliquote una delle quali viene addizionata con Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS broth), mentre l'altra con Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth (MKTnbroth).

L' RVS broth viene incubato a $41,5 \pm 1$ °C for 24 h \pm 3 h, e il MKTn broth a 37 ± 1 °C for 24 h \pm 3 h.

Semina e identificazione

La semina viene effettuata su due terreni solidi : Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar) ed un terreno complementare che permetta l'identificazione di Salmonelle lattosio-positive. L'XLD agar viene incubato a 37 ± 1 °C ed esaminato dopo 24 ± 3 h, l'altro terreno viene incubato in accordo con le indicazioni fornite dal produttore. Il terreno più utilizzato come secondo terreno solido è il Brilliant green agar (BGA)

Conferma delle colonie

Le colonie presunte di Salmonella appaiono in entrambi i terreni come colonie circolari di piccole dimensioni, con centro nero e una zona di alone, trasparente e rossastra dovuta al viraggio dell'indicatore. Le varianti H₂S negative cresciute su XLD agar sono rosa e al centro si mostrano rosa più scure. Le varianti lattosio positive sono gialle e possono presentare o meno un annerimento.

Da ogni piastra sono isolate almeno una colonia considerata positiva e altre quattro colonie nel caso la prima risultasse negativa, Se nella piastra vi fossero meno di cinque colonie considerate tipiche vanno prese tutte le colonie sia tipiche che atipiche. Le colonie vengono poi seminate su di una piastra agar arricchita con nutrienti per permettere alle colonie ben isolate di sviluppare. La classificazione viene effettuata sottoponendo le colonie isolate ad appropriati test biochimici e sierologici di conferma. I test principali che vengono utilizzati per la conferma sono : Triple Sugar Iron Agar, Urea Agar, Moeller Lysine Decarboxylase Broth, Test Onpg, MR-VP Medium e Tryptone Thryptophan Medium.

2.2.2. Ricerca di *Salmonella* spp. da campioni clinici

La ricerca inizia con la semina del campione nel rapporto di circa 1:10 in terreno d'arricchimento, usando Brodo selenito (secondo Muller-Kauffmann) oppure Brodo tetrionato (secondo Preuss), da porre in incubazione a +37 °C per 18-24 ore. Segue la piastratura su terreno solido selettivo e/o differenziale (Gassner Agar, Brilliant Green Agar). Esclusivamente nei casi di forte sospetto, è consentito affiancare agli arricchimenti anche la semina diretta del campione su piastre di terreni selettivi, mediante strisciamento di un frammento di campione. Ciò avviene, ad esempio, nell'esame di feci (coprocultura) e di organi prelevati alla necropsia (rene, fegato, milza, linfonodi). Dopo incubazione delle piastre a +37 °C per 24 ore, le colonie sospette vengono trapiantate su terreno Kligler Iron Agar, da incubare a +37°C per 24 ore prima della lettura, che consente di apprezzare le fermentazioni di glucosio e lattosio, la formazione di gas dal glucosio e la produzione di H₂S. L'aspetto tipico della coltura su Kligler (fondo del terreno giallo con annerimento e bolle di gas, becco di clarino rosso visibile in figura 1) consente di selezionare i campioni sui quali procedere. I campioni positivi o sospetti derivanti dal Kligler vanno verificati mediante agglutinazione rapida su vetrino con siero polivalente anti-Salmonella. Una o due provette sospette, positive all'agglutinazione, vanno sottoposte a identificazione biochimica, mediante una serie di *test* che comprenda le principali prove (come indolo, urea, lisina decarbossilasi).

2.3. Caratteristiche antigeniche

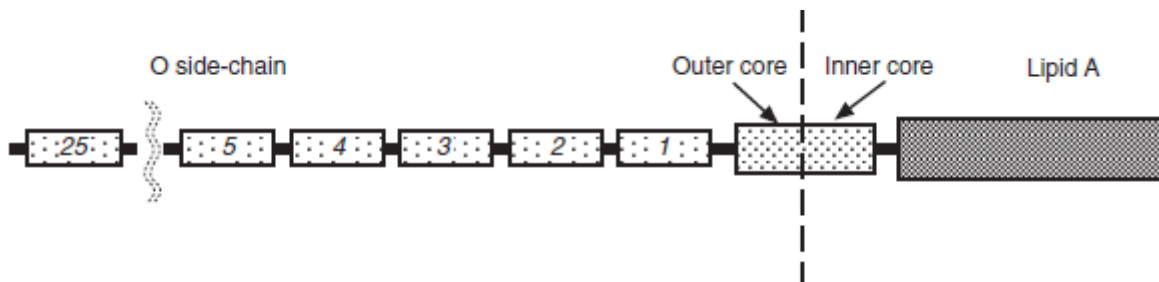
La cellula batterica di una *Salmonella* possiede numerosi antigeni, tra questi quelli più conosciuti ed importanti per la classificazione su base sierologica e per la patogenicità possiamo nominare gli antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcool, gli antigeni ciliari (H) termolabili, l'antigene di virulenza (Vi) e gli antigeni delle fimbrie (F).

- **Antigene O**

L'antigene O è presente sulla membrana esterna della cellula batterica, associato a molecole lipopolisaccaridiche (LPS) ed è formato da due parti: la prima, più interna, è composta da cinque carboidrati ed è comune a tutti gli enterobatteri; la seconda, più esterna, è formata da catene polisaccaridiche, ciascuna delle quali contiene una sequenza di alcuni oligosaccaridi (Figura 3). Dal differente posizionamento degli oligosaccaridi nelle catene dipende la diversità degli antigeni

somatici. Attualmente si conoscono 65 diversi antigeni O identificati con numeri arabi. Le Salmonelle che presentano analogie nella struttura dell'antigene O vengono comunemente e per convenzione riunite in sierogruppi (A, B, C).

Figura 3. Rappresentazione schematica dell'Antigene somatico O (Rycroft, 2000)



- **Antigeni H**

Nelle specie mobili di Salmonella (sono eccezioni *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* che non sono mobili) sono presenti gli antigeni flagellari o ciliari meglio conosciuti come antigeni H. Oggi se ne conoscono circa 35. Gli antigeni H sono di natura proteica e vengono inattivati dal calore. Questi possono presentarsi in fase singola o in due fasi, la Fase 1 (specificità) che rappresenta il sierotipo e la Fase 2 (aspecifica) comune a più sierotipi. Le fasi possono presentarsi contemporaneamente durante le prove di agglutinazione o separatamente. Le Salmonelle bifasiche tendono a mostrare prevalentemente solo una delle due fasi, è quindi necessario far invertire le fasi per poterle tipizzare. Solitamente le Salmonelle non perdono la struttura antigenica H, ma *in vitro* possono andare incontro a fenomeni reversibili di perdita dei flagelli dovuti alla presenza di sieri aggiunti che inibiscono la funzionalità dei flagelli.

- **Antigeni Vi**

Alcune Salmonelle presentano anche un terzo tipo di antigene, chiamato Vi (da virulenza), e i ceppi che lo possiedono risultano essere più virulenti (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C*, *S. Dublin*). Esso ha la caratteristica di mascherare gli antigeni O, rendendoli inagglutinabili dai sieri somatici, per cui è necessario in questi casi riscaldare a 100 °C per un'ora la sospensione batterica per renderla nuovamente agglutinabile. Il fenomeno della perdita di agglutinabilità con i sieri somatici è conosciuto come variazione reversibile, chiamata V→W.

- ***Antigeni F***

Gli antigeni F sono definiti antigeni delle fimbrie, la loro prima descrizione venne eseguita da Duguid e Gillies nel 1958, anche se una più approfondita conoscenza della varietà e delle funzioni delle fimbrie è stata raggiunta solo recentemente. Nel loro studio Duguid e Gillies avevano notato un'associazione fra le Salmonelle che presentavano le fimbrie e la capacità del batterio stesso di agglutinare certi tipi di eritrociti. Le fimbrie anche se raggruppate in diverse classi sembrano giocare un ruolo da protagoniste nella colonizzazione della mucosa intestinale dovuta anche alla loro capacità di creare un'emo-agglutinazione (Duguid, 1966/ 1976).

3. Classificazione e nomenclatura

Il genere *Salmonella* presenta numerosi sierotipi, distinti in base alla composizione dei vari antigeni somatici e flagellari o a caratteristiche biochimiche. La classificazione è stata più volte rimaneggiata. Inizialmente ogni nuovo ceppo isolato da forma clinica o ospite veniva considerato come una nuova specie, furono prima White e poi Kauffmann a tipizzarle secondo il sierotipo, fu però Le Minor a classificarne le sottospecie.

Il genere viene distinto in due specie: *S. Enterica* e *S. Bongori*. La specie enterica è a sua volta suddivisa in sei sottospecie: enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae, indica. L'attuale classificazione che deriva da quelle di Kauffmann-White e di Le Minor viene aggiornata annualmente dal *WHO Collaborating Centre for References and Research on Salmonella*.

3.1 Classificazione secondo Kauffmann-White

Già nel 1931 Kauffman ipotizzò e presentò lo schema di classificazione delle salmonelle, ampliando e riarrangiando un precedente lavoro di Schultze, White e Scott.

Il metodo di classificazione è basato su tre argomenti principali che permettono di classificare il microrganismo:

- il genere è costituito da batteri bastoncellari, gram-negativi, asporigeni, tendenzialmente mobili, con buone capacità di crescita sui terreni comuni, fermentanti il glucosio ma non il saccarosio e il lattosio (con alcune eccezioni), riducenti i nitrati ma non l'indolo, non idrolizzanti l'urea, il Voges-Proskauer e l'adonite;
- il genere viene diviso in quattro sotto-generi (I, II, III, IV) che vengono differenziati in base alle prove biochimiche indicate in tabella 3;
- i ceppi che presentano la stessa formula antigenica, anche se con marcate differenze biochimiche vengono raggruppati nello stesso sierotipo.

Tabella 3. Prove biochimiche per differenziare i sottogeneri di *Salmonella* spp. (Le Minor *et al.*, 1987).

Test	I	II	III	IV
Fermentazione dulcite	+	+	-	-
Fermentazione lattosio	-	-	+	-
Fermentazione salicina	-	-	-	+
Fermentazione malonato	-	+	+	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	+

3.2. Classificazione secondo Le Minor

La classificazione di Le Minor permette di differenziare le sottospecie di *Salmonelle*, e permette anche di differenziare *S. Enterica* da *S. Bongori* (Tabella 4). Le sottospecie derivanti da *S. Enterica* vengono rappresentate da un nome che indica di solito il luogo geografico di primo isolamento del sierotipo. I sierotipi appartenenti ad altre sottospecie vengono nominati con la loro formula antigenica seguita dal nome della sottospecie come indicato da Le Minor.

Tabella 4. Classificazione attuale del genere *Salmonella* (Le Minor *et al.*, 1987).

Specie	Sottospecie						Numero sottospecie
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	I II IIIa IIIb IV VI V
<i>S. bongori</i>							
Test	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	V
Fermentazione:							
<i>dulcitate</i>	+	+	-	-	-	+/-	+
<i>lattosio</i>	-	-	-	+	-	+/-	-
<i>salicina</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>sorbitolo</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>malonato</i>	-	+	+	+	-	-	-
<i>d(+)-tartrato</i>	+	-	-	-	-	-	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	-	+	-	+
ONPG	-	-	-	+	-	+/-	+

3.3. Tipizzazione sierologica

Kauffmann pubblica nel 1966 il suo libro : “*The Bacteriology of Enterobacteriaceae*”, in cui codifica un sistema di tipizzazione delle *Salmonelle* specificando che le prove biochimiche sono necessarie per la determinazione del genere ma che sono le tipizzazioni a determinare la specie. La reazione sierologica più comunemente utilizzata per determinare la specie di una colonia di *Salmonelle* è la prova sierologica dell’agglutinazione. L’agglutinazione rapida su vetrino per la diagnosi degli antigeni O ed H è la più utilizzata e la più veloce nella determinazione. Si basa su cinque fasi :

- preparazione dell’antigene;
- agglutinazione somatica O;
- agglutinazione flagellare H (prima);
- eventuale separazione fra fase 1 e fase 2;
- agglutinazione flagellare H (seconda);

Preparazione dell'antigene

L'antigene somatico O viene preparato secondo il metodo di Roscka prelevando solo le colonie che presentano fase S (liscia) in quanto se presentassero la fase R (ruvida) non presenterebbero l'antigene O. Le colonie selezionate vengono fatte crescere su di un terreno solido quale Agar glicerinato per 20-28 ore a 35-37°C, fino alla formazione di una patina superficiale uniforme. La patina viene raccolta e tramite svariate fasi di centrifugazione, trattamenti con il calore, solubilizzazione e disidratazione i batteri ed i detriti degli stessi sono allontanati dall'antigene che viene disciolto in una soluzione fisiologica prima di essere somministrato agli animali.

L'antigene flagellare H deriva da ceppi seminati in brodo nutritivo ed incubati a +37 °C per 24 ore. La brodocoltura viene centrifugata per tre volte, risospendendo ogni volta il sedimento in soluzione fisiologica fino all'allontanamento dei residui batterici dall'antigene. Gli antigeni sono quindi somministrati agli animali (cavalli, asini, conigli) e dal sangue degli animali vengono ricavati i sieri O e H.

Agglutinazione somatica O :

Nell'agglutinazione somatica rapida le cellule batteriche si uniscono per i poli, formando rapidamente degli aggregati di tipo finemente granulare all'occhio dell'osservatore. Questi aggregati, oltre che di piccole dimensioni, sono piuttosto labili e si lasciano sciogliere se l'operatore eccede nell'agitare la miscela siero-antigene. In pratica, si pone un vetrino porta-oggetti su un piano di vetro illuminato da luce trasmessa e si depone sul vetrino una goccia del siero diagnostico. Viene poi prelevata una colonia che viene stemperata in più riprese nella goccia, la reazione risulta positiva nel caso in cui si formino piccoli granuli bianchi all'interno della goccia che diventa trasparente, risulta invece negativa se si dovesse notare una goccia torbida e lattescente.

Agglutinazione flagellare H :

L'agglutinazione flagellare rapida viene effettuata analogamente alla somatica O con l'unica accortezza di diluire il siero H che essendo un siero polivalente OH (non sono stati eliminati gli antigeni O) non deve andare ad avere azione a livello degli antigeni O. Oltre a questo l'agglutinazione flagellare porta alla formazione di agglutinato di dimensioni maggiori quindi facilmente visibile.

Separazione fase 1 da fase 2

Dopo aver effettuato le agglutinzioni O e la prima agglutinazione H, una parte della struttura antigenica del ceppo in esame è già nota, ad esempio la struttura *1,9,12 : g,m-*. Dalla consultazione dello schema di Kauffmann-White (visibile nella figura 4) si può desumere che a questa struttura antigene corrisponde il sierotipo *S. Enteritidis*, che possiede una fase sola e per questo è detto monofasico. In casi come quello portato ad esempio la tipizzazione è già conclusa.

Tuttavia, la maggior parte delle *Salmonelle* è bifasica. Al momento della prima agglutinazione H non si può prevedere con quale fase il ceppo in esame si presenterà. Difatti, esistono uguali probabilità che esso mostri gli antigeni della fase 1 oppure quelli della fase 2; raramente, il ceppo può anche mostrare contemporaneamente entrambe le fasi 1 e 2. Vengono quindi usate delle procedure atte a permettere la visualizzazione della seconda fase che normalmente rimarrebbe inespressa.

Agglutinazione flagellare H

Viene effettuata un'altra agglutinazione flagellare per ottenere la seconda parte della struttura antigenica nelle *Salmonelle* bifasiche.

Lettura elenchi di tipizzazione come riportato nel libro *Tipizzare le Salmonelle* (Zavanella, 2001)

L'elenco è diviso in gruppi contraddistinti da lettere maiuscole dell'alfabeto (A, B, C...) oppure da numeri (51, 52, 53...) che corrispondono ad altrettanti *gruppi O*.

La prima colonna contiene il *nome* del sierotipo. In mancanza di un nome specifico ricorre il termine generico di "salmonella". Accanto al nome si può trovare un numero romano, che significa *sotto-specie II*.

Nella seconda colonna sono contenuti gli *antigeni somatici O*, indicati da uno o più numeri arabi.

Quando un antigene è sottolineato, oppure scritto tra parentesi, esso può mancare

Nella terza colonna sono scritti gli *antigeni H della cosiddetta fase 1*

Nella quarta colonna figurano gli *antigeni H della cosiddetta fase 2*.

Nella quinta colonna sono citate alcune caratteristiche biochimiche e sierologiche del sierotipo.

Nella sesta colonna si trovano brevi annotazioni di carattere epidemiologico, ad esempio le fonti da cui si isola più frequentemente.

Figura 4. Esempio di classificazione degli Antigeni O ed H di *Salmonella* spp. (Zavanella, 2001)

Gruppo A (O 1,2,12)

paratyphi A	<u>1,2,12</u>	a	(1,5)		uomo
nitra	2,12	g,m	-		

4. Epidemiologia della infezioni da *Salmonella* spp.

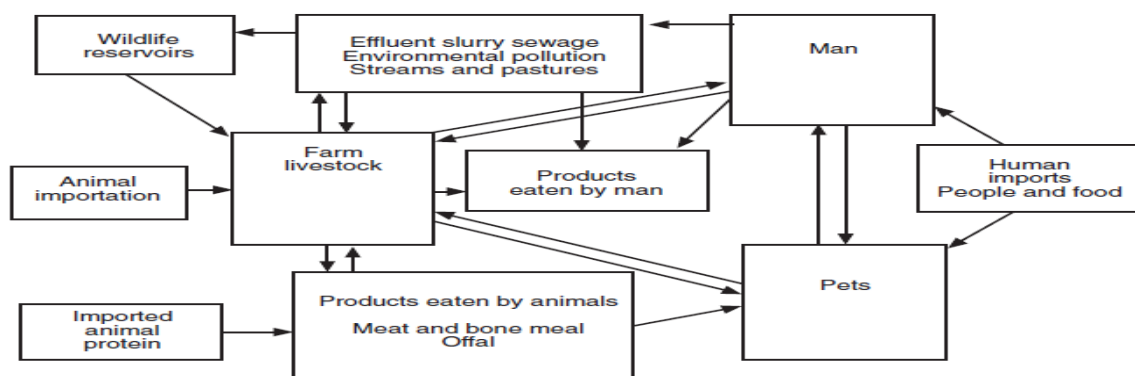
L'epidemiologia di *Salmonella* spp. è un argomento complicato da trattare in quanto si basa sulla conoscenza delle caratteristiche sia del ciclo biologico della gente eziologico, sia del ciclo biologico dei suoi animali serbatoio, dei vettori e della sua diffusione ambientale. Ovviamente l'uomo è parte integrante di questo ciclo biologico entrandone a far parte come soggetto ed oggetto di zoonosi. (Humphrey, 2000)

4.1. Serbatoi animali

Lo sviluppo di un ciclo epidemiologico di *Salmonella* spp. è associato alla presenza di serbatoi animali, questi animali variano al variare dei sierotipi, alcuni vengono definiti specie specifici (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum* per il pollame) altri vengono definiti ospiti adattati (*S. Dublin* nei bovini) altri ancora come *S. Typhimurium* sono praticamente ubiquitari e possono infettare specie diverse. Le infezioni provocate da *Salmonella* spp. si distinguono in forme tifoidee, in cui l'uomo rappresenta l'unico serbatoio del microrganismo, e forme non tifoidee, responsabili di forme cliniche a prevalente manifestazione gastroenterica.

I principali Sierotipi che infettano gli animali da reddito in Italia sono: *S. Dublin* e *S. Typhimurium* nei bovini, nelle specie aviarie abbiamo *S. Typhimurium*, *S. Hadar* e *S. Enteritidis*, nei suini abbiamo *S. Typhimurium* e *S. Derby*. Il microrganismo è fra l'altro molto resistente all'interno dei portatori sani che possono continuare ad eliminarlo per molto tempo. Il ceppo *S. Typhimurium* DT104 è stato ritrovato in campioni di feci di vacche fino a 18 mesi dalla malattia (Evans, 1996). Le infezioni quindi derivano da una moltissime possibili contaminazioni che includono animali selvatici, ma anche animali domestici come portatori sani ed animali esotici quali tartarughe o rettili spesso caratterizzati dall'essere portatori di sierotipi rari. Qualsiasi interazione esistente fra uomo e animale è quindi ipoteticamente soggetta al rischio di un contagio.

Figura 5. Ciclo epidemiologico dell'infezione da *Salmonella* spp. (Cameron, 2012)



4.2. Vie di trasmissione

La via di trasmissione principale è la via oro fecale, e nell'uomo avviene maggiormente tramite l'ingestione di alimenti animali contaminati anche se l'infezione interumana è spesso presente come quella per contatto diretto con l'animale. Non è ancora chiaro il ruolo dell'infezione dovuta al consumo di alimenti vegetali contaminati con deiezioni animali. Essendo dei microrganismi ubiquitari le *Salmonelle* possono sviluppare e persistere per lunghi periodi in ambienti variabili ed in condizioni molto eterogenee. Lo sviluppo di infezioni a livello degli allevamenti sia avicoli che di grossi animali da reddito è solitamente associato alla presenza di portatori sani che eliminano il patogeno con le feci ma oltre a questa causa si possono imputare colpe stessi agli allevatori, nello smaltimento non tempestivo delle feci. Si presentano spesso casi di infezioni derivanti da mangimi e foraggi contaminati che causano uno sviluppo molto rapido e diffuso all'interno dell'azienda. Anche l'acqua di bevanda contaminata è un veicolo molto serio di infezione. Nella fase di macellazione le contaminazioni possono essere molto varie: vi possono essere problemi in fase di scuoiatura, contaminazione degli strumenti per la macellazione, contaminazioni derivanti da una scorretta eviscerazione. Questi problemi sono solitamente evitati o ridotti tramite l'utilizzo di docciature della carcasse animali e abbattimenti rapidi delle temperature grazie a tunnel ad aria forzata e refrigeratori. La fase delle lavorazioni successive dovrebbe essere teoricamente più sicura in quanto vengono adottate delle misure di HACCP che permettono l'abbattimento delle cariche batteriche, tuttavia non sempre queste misure sono correttamente eseguite o rispettate. Tutte queste possibili contaminazioni del prodotto finale vanno a creare un pericolo per la salute del consumatore.

4.2.1. Alimenti

Il fatto di essere ubiquitarie, e di sviluppare a temperature comprese fra i 7°C e i 46°C permette alle Salmonelle di contaminare e poi sopravvivere nella maggior parte degli alimenti conservati o manipolati in modo scorretto. Spesso le infezioni sono dovute ad uno tempo, che intercorre fra la preparazione dell'alimento e il consumo, troppo lungo. Il ruolo degli operatori della catena alimentare è di vitale importanza sia per evitare contaminazioni derivanti dal personale operante, sia per evitare contaminazioni derivanti dall'ambiente.

Le uova e i prodotti derivati sono il primo veicolo di trasmissione di Salmonella nell'uomo soprattutto per *S. Enteritidis*. L'uovo infatti può essere contaminato nell'ovaio per trasmissione verticale, nella cloaca e al momento della deposizione ma molto spesso in seguito a contaminazione fecale dei nastri di trasporto delle uova. Negli ultimi due casi i batteri si trovano sulla superficie dell'uovo tuttavia possono penetrarvi attraverso microfratture o attraverso i pori presenti nel guscio necessari per lo scambio gassoso fra l'interno e l'esterno. La penetrazione del guscio è fortemente favorita dalla presenza di umidità è per questo che la Commissione Europea ha deciso di non rendere obbligatoria la refrigerazione delle uova durante la fase di commercializzazione; evitando così possibili interruzioni della catena del freddo che potrebbero portare alla formazione di condensa sulla superficie delle uova. La contaminazione interna si sviluppa principalmente a livello della membrana vitellina e dello strato di albume che la circonda ma la scarsa presenza di ferro nell'albume limita lo sviluppo dei batteri entro limiti accettabili. La moltiplicazione, che avviene successivamente alla penetrazione del tuorlo, (molto più ricco in ferro) varia in base alla temperatura e al tempo di conservazione. In uova conservate a temperature inferiori ai 20°C la penetrazione del tuorlo comincia dopo circa tre settimane, a temperature superiori 20°-30°C in pochi giorni. La maggior parte dei casi di tossinfezione però avviene non tanto tramite consumo di uova tal quali ma dall'ingestione di prodotti derivati non pastorizzati le cui preparazioni successive possono permettere lo sviluppo del batterio. A livello di catena di macellazione, nei bovini, suini ed equini la presenza di Salmonelle sulla superficie del prodotto è dovuta a contaminazioni di tipo fecale e/o scarsa igiene all'interno del macello stesso. La contaminazione intramuscolare ha una frequenza molto bassa e le docciature (se effettuate correttamente) riducono di molto la carica superficiale, questo permette di mantenere un buono stato sanitario delle carni in uscita dai macelli. Il problema maggiore parlando di carni si riscontra a livello dei prodotti lavorati dove l'aumento della superficie esposta all'aria dovuto alla macinazione e le scorrette misure igieniche possono far proliferare alcuni ceppi aerobi. Parlando

invece della catena di macellazione delle carni avicole i problemi aumentano, in quanto già in fase di trasporto sono possibili contaminazioni di animali sani dovuti a sovraffollamento e stress che comportano una diffusione estremamente rapida del patogeno all'interno della partita di animali. Da uno studio americano sull'infezione nei mattatoi si può evincere che delle 5.946 partite di volatili controllate, 121 (2.2%) erano positive per *Salmonella* prima della macellazione. Di queste 121, 18 dopo la macellazione risultavano negative ai test per *Salmonella*, questo risultato era evidenziabile in 9 mattatoi su 347 esaminati. Mentre delle 5.824 partite che risultavano negative prima della macellazione solo 2.590 (44.7%) risultavano ancora negative dopo la macellazione. Tale studio ha messo in evidenza una tendenza all'aumento della contaminazione della carne dopo o durante la macellazione molto elevata (Cameron, 2012).

4.2.2 Ambiente

L'ambiente rappresenta una parte importante del ciclo biologico per *Salmonella* spp. Le *Salmonelle* sono ubiquitarie nell'ambiente e sopravvivono in ambienti umidi o a temperature inferiori allo zero anche per parecchi mesi. Fonti di pericolo sono anche lo smaltimento dei reflui e l'irrigazione. Il ritrovamento di *Salmonella* spp. nell'acqua potabile indica la presenza di un serio problema nella gestione del sistema di approvvigionamento. La ricrescita delle *Salmonelle* nel sistema di distribuzione va evitata attraverso il mantenimento di una bassa torbidità e un adeguato livello di clorazione residua, oltre ad un ridotto carico di carbonio organico assimilabile. La persistenza ambientale è stata dimostrata molto bene da uno studio condotto su *S.Typhimurium* DT204c, che è stata isolata in un alimento per vacche da latte 2,5 anni dopo l'isolamento nella fabbrica originale (McLaren, 1991). L'elevata resistenza ambientale influisce fortemente sulla disseminazione dell'infezione che si sviluppa anche attraverso i vettori non animali. Ambienti fortemente contaminati con feci di animali infetti sono un ottimo serbatoio per *Salmonella* che tramite scorrette gestioni delle deiezioni tende ad essere dispersa e diffusa all'interno di fiumi, pascoli o campi adibiti all'agricoltura. La contaminazione dei pascoli è molto importante perché porta all'infezione animali precedentemente sani tramite l'alimentazione con vegetali contaminati. L'infezione delle derrate alimentari vegetali è un problema da non sottovalutare in quanto può portare sia alla infezione di animali da reddito che si cibano delle derrate sia ad un'infezione umana dovuta al consumo dei vegetali.

5. Infezioni da *Salmonella* spp. nell'uomo e negli animali

L'infezione da *Salmonella* è un fenomeno estremamente complesso. Dopo essere stato ingerito il batterio colonizza l'intestino ed invade la mucosa intestinale.

Tramite i vari fattori di virulenza le *Salmonelle* sono in grado di mettere in atto le fasi dell'infezione. Lo sviluppo di una infezione sintomatica dipende dal numero di batteri ingeriti (la dose minima infettante è ipotizzata tra 10^2 e 10^3 cellule), ma la dose varia molto in relazione al sierotipo, lo stato di salute e la categoria di persone/animali infettati.

5.1. Meccanismo patogenetico

Bisogna innanzitutto evidenziare come vi sia una correlazione fra genotipo e patogenicità. Sono infatti presenti *Salmonelle* patogene e non all'interno di uno stesso sierotipo, infatti solo alcuni ceppi che possiedono determinati fattori di virulenza, codificati a livello cromosomiale e plasmidico, sono in grado di produrre malattia, la cui gravità varia al variare dei fattori espressi:

- 1) I fattori di colonizzazione (le fimbrie) permettono al microrganismo di aderire alla superficie cellulare e quindi di moltiplicarsi, evitandone l'allontanamento (ad esempio ad opera della peristalsi intestinale):
- 2) I fattori di invasività, in genere, consentono di superare le prime linee di difesa dell'ospite, come ad esempio l'epitelio intestinale, e fare in modo che l'infezione da localizzata diventi sistemica. Questi fattori di invasività sono dovuti a un complesso di geni (SPI-1) che permettono al batterio di penetrare dentro la cellula. Il processo d'invasione è molto complicato e comporta l'attivazione di più di quaranta geni.

Recentemente è stato dimostrato che la *Salmonella* può infettare nell'enterocita, con un apposito sistema d'escrezione, costituito da due proteine in grado d'influire sugli enzimi che alterano o ripristinano la normalità del citoscheletro. In questo caso è il batterio stesso che a prepararsi le cellule M della mucosa intestinale da invadere:

- 3) I fattori antifagocitari sono strutture o proteine che impediscono la digestione enzimatica della cellula batterica, sono dunque importanti per la sopravvivenza all'interno di un organismo ospite:

4) I fattori tossici sono rappresentati dalle esotossine e dall'endotossina. Le prime sono sintetizzate dai microrganismi mentre la seconda è parte integrante della parete dei batteri Gram-.

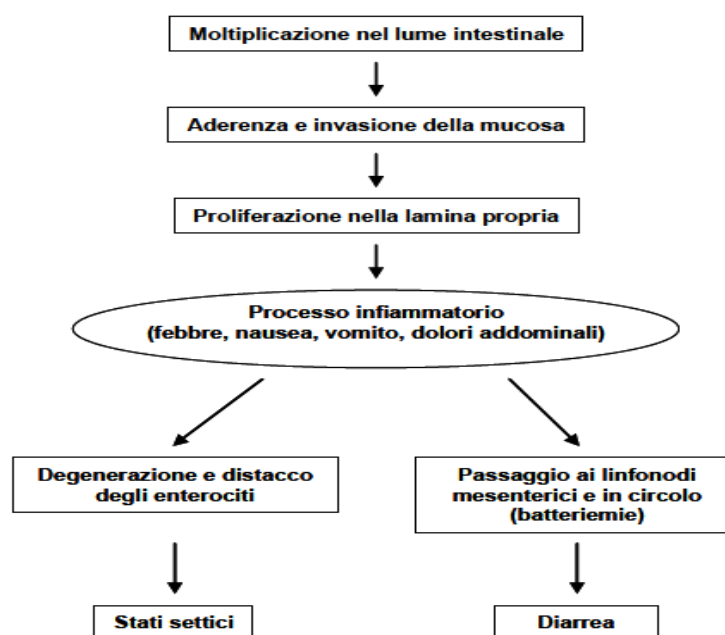
5.2 Sintomatologia nell'uomo

Salmonella spp. è uno dei più comuni agenti eziologici che causano enteriti con ciclo oro fecale. Oltre alla forma gastro-enterica è presente una forma sistemica che si sviluppa successivamente ed è spesso associata a bambini, neonati, anziani od adulti con sistema immunitario precario.

5.2.1. Forma gastro-enterica

La patogenesi di *Salmonella* spp. comincia a livello intestinale dove avviene un'intensa replicazione, cui fanno seguito la colonizzazione e l'invasione della mucosa. I batteri a questo punto penetrano all'interno delle cellule dove vengono inglobati dai fagosomi ma senza subire alcuna complicazione, si liberano dai fagosomi e muovono verso la lamina propria dove avviene una ulteriore replicazione. È proprio questa seconda fase replicativa a causare un processo infiammatorio caratterizzato da congestione, edema e forti afflussi di cellule polimorfonucleate e macrofagi). In questa fase viene rilasciato il lipopolisaccaride batterico di membrana (componente batterico dei gram-) che provoca febbre, nausea, vomito e forti dolori addominali.

Figura 6. Flow chart Patogenesi di *Salmonella* spp. (Graziani, 2005)



Il vomito è particolarmente abbondante nei bambini, i dolori addominali sono da diffusi a localizzati nella regione epigastrica. La diarrea insorge con una tempistica variabile da 10 a 12 ore ed è determinata sia dal distacco degli enterociti che dal loro metabolismo alterato. Le feci risultano molli ed acquose ma nel secondo o terzo giorno possono presentare muco misto a sangue. Nella tabella 5 è possibile osservare la percentuale di sintomi presenti in corso di infezione da *Salmonella* spp.

Tabella 5. Percentuale di sintomi presenti in corso di infezione da *Salmonella* spp. (Graziani *et al.*, 2005)

Sintomo	Percentuale
Diarrea	50-100
Dol.addominali	40-90
Febbre	40-80
Nausea e vomito	20-50

La sintomatologia regredisce in 2-4 giorni e nella gran parte dei casi la guarigione è completa, ma il soggetto può rimanere portatore ed eliminare batteri con le feci per moltissimo tempo.

5.2.2. Forma sistemica

Le forme sistemiche, possono presentarsi come batteriemie, setticemie e infezioni localizzate. Si sviluppano soprattutto nei bambini e in pazienti immuno-depressi come conseguenza di gastroenteriti acute. A tali patologie sembrano essere associati in particolare alcuni sierotipi, come *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* e in misura minore *S. Enteritidis* ed *S. Typhimurium*. Il passaggio da una semplice forma intestinale ad una forma sistemica è dovuto alla resistenza di *Salmonella* al fagocita all'interno dei granulociti e dei monocito-macrofagi. Infatti i batteri sfruttano i fagociti come veicolo per colpire altri distretti quali i linfonodi mesenterici e quindi il circolo sistemico portando a semplici batteriemie o manifestazioni settiche.

Batteriemia: una condizione di batteriemia transitoria si manifesta nell'1-5% dei casi di gastroenterite acuta. La batteriemia da *Salmonella* spp. si manifesta con febbre e brividi.

Infezioni extraintestinali: dopo che le *Salmonelle* sono penetrate nel circolo ematico, hanno la capacità di causare metastasi e provocare infezioni purulente, focali in quasi tutti gli organi.

Solitamente le infezioni focali comunemente interessano lo scheletro, le meningi ed i siti intravascolari.

La Salmonella è una causa frequente di osteomielite nei bambini con anemia falciforme. Spesso l'osteomielite si manifesta in sede di traumi precedenti. La meningite compare principalmente nei lattanti ed è caratterizzata da un elevato tasso di mortalità (50%) e sequele neurologiche nonostante una corretta terapia antibiotica. I sierotipi che causano la maggior parte delle infezioni focali extraintestinali sono la *S.Typhimurium* e la *S.Choleraesuis*.

Febbre tifoide: è una sindrome clinica sistemica prodotta da alcuni tipi di Salmonella. Essa comprende i termini tifo, causato da *S.Typhi*, e paratifo, causato da *S.Paratyphi A*, *S.Paratyphi B*, *S.Paratyphi C*. La salmonella ingerita si moltiplica nell'intestino tenue e, dopo essere penetrata attraverso la mucosa e i vasi linfatici, raggiunge il torrente sanguigno e la cistifellea (fase asintomatica): qui la salmonella si moltiplica e diffonde nell'intestino con la bile per riprendere la via del circolo e causare batteriemia sintomatica. Il periodo di incubazione è solitamente di 7-14 giorni, ma può andare da 3 a 30 giorni.

5.3. Sintomatologia animale

Salmonella spp. colpisce indifferentemente animali a sangue caldo e a sangue freddo. Spesso non vi è manifestazione clinica ma, se la malattia si sviluppa, questa colpisce in particolar modo l'apparato digerente. Come per l'uomo la via principale di trasmissione è quella oro-fecale e le fonti principali sono l'acqua, gli alimenti e l'ambiente stesso. Per alcuni sierotipi, in particolare *S.Enteritidis* e *S.Typhimurium*, risulta particolarmente importante la trasmissione verticale che comporta, ad esempio nelle specie avicole, il passaggio dell'infezione dai riproduttori alla progenie. Il processo porta solitamente a gastroenteriti come conseguenza della colonizzazione intestinale. Le Salmonelle dopo aver raggiunto i villi dell'ileo e del colon si moltiplicano e invadendo le cellule vanno a disporsi a livello della lamina propria. La risposta infiammatoria del tutto simile a quella umana porta l'animale alla liberazione di prostaglandine che inducono la liberazione di acqua nel lume intestinale, con manifestazioni cliniche quali diarrea vomito inappetenza, innalzamento della temperatura, shock e sporadicamente la morte. Se le Salmonelle riescono a passare nel circolo sanguigno, si ha setticemia e disseminazione in vari organi (cuore, polmoni, cervello, linfonodi, ecc.), con gravi manifestazioni cliniche associate.

6. Misure di profilassi nell'allevamento avicolo

L'allevamento avicolo rappresenta una componente fondamentale e ad alto rischio nella trasmissione di *Salmonella* spp. all'uomo. Per questo motivo devono essere utilizzate delle pratiche di allevamento appropriate e di gestione della filiera atte a contenere il possibile insorgere di patologie entro limiti di accettabilità.

Le infezioni principali da *Salmonella* spp. risultano derivare dal consumo di uova e prodotti derivati, e di conseguenza l'allevamento della gallina ovaia rappresenta il principale mezzo di diffusione di tali patogeni all'uomo. La conoscenza della struttura della filiera avicola è quindi importante per poter mettere in atto delle adeguate misure di controllo.

6.1. Organizzazione della filiera

L'azienda avicola produttrice di uova da consumo presenta una organizzazione semplice basata su di una struttura prevalentemente lineare che comincia nel momento della ricezione delle pollastre o delle galline ovaie prodotte da aziende avicole di moltiplicazione. L'allevamento viene quindi diviso nelle varie tipologie: a terra, all'aperto, in gabbia o biologico. Le uova prodotte sono smistate fra le due possibili destinazioni finali: uova da consumo diretto oppure ovo-prodotti.

Negli ultimi anni la produzione in Italia si è concentrata in poche aziende che detengono circa il 50/60% del mercato e che hanno un controllo diretto su tutte le fasi della filiera. Questi allevamenti detengono in media circa 20.000-70.000 capi ma solitamente presentano consistenza di circa 100.000 capi per pollaio (Merluzzi, 2008). Per la produzione di uova nell'allevamento intensivo vengono utilizzati soggetti prelevati da pochi ceppi derivanti da aziende di grosse dimensioni che forniscono ibridi commerciali. I ceppi attualmente più allevati in Italia sono: Isabrown e Hy-Line brown che da soli coprono circa il 50% del mercato.

L'allevamento successivo alla ricezione dei pulcini dalle aziende riproduttrici viene distinto in due fasi: l'allevamento della pollastra (da 1 giorno a 16 settimane di vita) e l'allevamento della gallina ovaia (16 settimane a 70-72 settimane). Le due fasi sono condotte in zone distinte dell'azienda e questo fatto è dovuto alle diverse esigenze alimentari e alle diverse caratteristiche degli animali.

Allevamento fase pollastra

L'allevamento della pollastra è una fase estremamente delicata perché da esso deriveranno le capacità produttive della gallina ovaioia, viene definito svezzamento e si basa sull'accrescimento sia fisico che dei caratteri sessuali delle pollastre. L'allevamento può essere effettuato a terra, o al chiuso in gabbia ma poichè l'allevamento dell'ovaioia viene effettuato prevalentemente in gabbia si preferisce cominciare da subito con un allevamento di questo tipo.

Allevamento dell'ovaioia in gabbia

Per l'allevamento della gallina ovaioia si applica la procedura del tutto pieno-tutto vuoto, che consiste nella presenza all'interno di uno stesso capannone di animali tutti dello stesso ceppo, della stessa età e quindi allo stesso stato di sviluppo che vengono eliminati contemporaneamente alla fine del ciclo produttivo. L'allevamento può essere effettuato come per la pollastra sia a terra che in gabbia ma solitamente il secondo viene preferito in quanto presenta notevoli benefici dal punto di vista sia qualitativo, sia igienico-sanitario. Questa tipologia di allevamento in Italia è rappresentata da circa il 90% delle uova prodotte. La produzione è regolamentata dalla direttiva CEE 88/166 che definisce la struttura e le disposizioni che queste gabbie possono assumere. Le strutture che queste gabbie assumono nei moderni allevamenti sono di due tipi: batterie piramidali di gabbie a piani sfalsati con fossa di raccolta delle deiezioni e batterie con gabbie completamente sovrapposte e nastri trasportatori.

Nel primo caso le gabbie sono poste su piani sfalsati: parte della gabbia (con pavimento in forato) è posta al di sopra della gabbia inferiore e parte è posta sopra la fossa biologica, le due gabbie sono separate da un piano inclinato che permette la caduta delle deiezioni direttamente nella fossa. Il principale inconveniente di questi impianti è creato dalla presenza e dallo sviluppo di insetti infestanti e batteri patogeni all'interno della pollina.

Nel secondo caso le gabbie sono poste su piani perfettamente sovrapposti e al di sotto di ogni gabbia è posto un nastro trasportatore che elimina le deiezioni senza farle cadere sulla gabbia sottostante.

In realtà, la Direttiva 74/1999 (CE), recepita in Italia nel 2003 con decreto legislativo 267/03 riconosce che le attuali tipologie di gabbie non garantiscono un livello accettabile di benessere alle galline ed impone la modifica delle stesse entro il termine ultimo del 2012.

Tale direttiva impone il miglioramento delle condizioni di benessere degli animali tramite: l'ampliamento degli spazi disponibili e la diminuzione della densità di allevamento. A cominciare

dal 2012 i sistemi di allevamento dovranno essere modificati e le gabbie potranno essere di solo due tipi: gabbie modificate/arricchite o sistemi alternativi alle gabbie.

Le gabbie modificate dovranno avere circa 550/750 cm² per capo, dovranno prevedere la presenza di un posatoio e di un bagno di sabbia per razzolare. Nei sistemi alternativi alle gabbie invece sarà previsto l'accesso ad uno spazio all'esterno e la presenza nello stesso di voliere a più livelli con nidi e posatoi. Le problematiche maggiori di questi metodi si basano sul fatto che i sistemi alternativi, rispetto alle gabbie comportano problemi di ordine igienico-sanitario. Infatti negli allevamenti all'aperto è molto più frequente la contaminazione diretta delle uova dovuta alle deiezioni. Inoltre il maggior contatto fra gli animali favorito da questa tipologia di allevamento comporta un aumento della possibilità di diffusione di patologie che comporteranno l'aumento dell'utilizzo di farmaci per il trattamento degli animali e del rischio di infezione del consumatore finale. Questo cambiamento nell'allevamento della gallina ovaiole rischia però di portare ad un aumento della positività da *Salmonella* spp. nei paesi mediterranei, maggiore rispetto ai Paesi Nordici. Basti ad esempio pensare che per la diffusione di malattie gastroenteriche dovute a microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* sono necessarie determinate condizioni ambientali, quali umidità e temperatura, che favoriscano la crescita e moltiplicazione dei microrganismi che possono poi infettare gli animali.

6.2. Contaminazioni da agenti patogeni in fase di allevamento

Le trasmissioni di *Salmonella* spp. avvengono spesso nell'allevamento e sono la primaria fonte di contagio. Per questo motivo i Regolamenti (CE) n°178/2002, 852/2004, 853/2004 e 183/2005 prevedono l'applicazione di Manuali di corretta prassi operativa che informino gli operatori del settore alimentare circa le misure igieniche da intraprendere.

Le contaminazioni da agenti patogeni che possono avvenire all'interno di un allevamento avicolo sono in genere di sei tipi:

- trasmissioni dovute al contatto con l'uomo;
- trasmissioni attraverso l'aria;
- trasmissioni attraverso l'acqua;
- trasmissioni attraverso il mangime;
- trasmissioni attraverso la lettiera;
- trasmissioni dovuta a vettori.

Trasmissioni dovute al contatto con l'uomo

Non sono solo gli animali a determinare la comparsa di patologie nell'uomo ma anche l'uomo può veicolare agli animali una serie di microrganismi in grado di causare patologie. Tutto il personale che lavora negli allevamenti dovrebbe riuscire quindi a mantenere degli elevati standard igienico-sanitari. Le contaminazioni più frequenti derivano dalla scarsa igiene del personale che lavora con indumenti sporchi o che non pulisce adeguatamente i propri strumenti di lavoro o che lavora anche se infetto. Un'altra fonte di infezione è dovuta ai visitatori a cui non dovrebbe essere permesso l'accesso agli stabilimenti o quantomeno non dovrebbe essere permesso l'accesso ai capannoni. Queste contaminazioni possono essere facilmente evitate fornendo ai lavoratori un'adeguata formazione riguardo alle norme di biosicurezza da attuare (COPA, 2012).

Trasmissioni attraverso l'aria

Gli animali dell'azienda spesso vengono infettati dalla presenza di polveri o aerosol all'interno dei capannoni che possono in molti casi fungere da veicolo per *Salmonella* spp. Uno studio condotto da Baskerville, mostra come dei gruppi di animali trattati con aerosol contenenti 10^3 - 10^5 UFC/m³ di *S. Enteritidis* venissero infettati dallo stesso sviluppando fenomeni diarroici, calo di peso e in alcuni casi morte.

Trasmissioni attraverso l'acqua

L'acqua di bevanda contaminata è spesso fonte di diffusione di *Salmonella* spp. nell'allevamento, gli animali giovani defecano o camminano negli abbeveratoi permettendo lo sviluppo del patogeno e la sua trasmissione ad altri animali. In uno studio condotto su di un allevamento inglese da Gauger e Greaves, venivano riscontrate positività, per *Salmonella* spp., in 108 abbeveratoi su 875 e la diffusione tramite l'acqua portava ad una diffusione nel gruppo di animali, precedentemente negativo, del 21,6%.

Trasmissioni attraverso il mangime

La trasmissione attraverso l'alimento avviene principalmente in quanto il mangime non viene in certi casi trattato correttamente dalle aziende di produzione, le quali non rispettano i requisiti di autocontrollo circa l'igiene dei mangimi o i requisiti di trattamento che devono essere applicati in fase di produzione. Nella produzione dei mangimi è di estrema importanza la scelta delle materie prime e il controllo delle stesse, un appropriato trattamento delle stesse eseguito tramite il calore

(pastorizzazione, pellettatura a caldo) e l'acidificazione (Pascucci, 2005). Spesso sono i cibi contenenti proteine animali quelli che più si prestano a contaminazione. La contaminazione dei mangimi è anche dovuta alle feci degli animali che spesso sono presenti dopo la somministrazione. Il mangime contaminato da *Salmonella* è quindi una fonte di contagio che si può riscontrare nell'alimento dal 7.2% al 25,7% dei campioni analizzati (Poppe, 1991).

Trasmissione attraverso la lettiera

La trasmissione di *Salmonella* spp. attraverso la lettiera è un problema che esiste per gli allevamenti di ovaiole all'aperto o che hanno già modificato le proprie strutture secondo la direttiva 74/1999, ma non per gli allevamenti che svolgono ancora l'allevamento in gabbia. La lettiera è la fonte di contagio per eccellenza fra gli avicoli, gli animali eliminano le proprie deiezioni nelle lettieri comuni e soprattutto ingeriscono un quantitativo molto elevato di *Salmonelle* in quanto spesso razzolano e beccano le feci degli altri animali. La contaminazione quindi si sviluppa molto rapidamente nel gruppo e dopo sette giorni di contatto fra animali infetti e non, raggiunge il 100% di animali colpiti (Snoeyenbos *et al*, 1969). Un altro studio mostra che *Salmonella* spp. viene isolata da circa il 47.4% dei campioni di lettiera analizzati e che circa il 75.9% degli animali ,dello stesso allevamento, è positivo (Poppe, 1991).

Trasmissione dovuta ai vettori

I roditori ed in particolare i topi svolgono un ruolo molto importante nelle infezioni da *Salmonella* spp. Essi non rappresentano la via di entrata del patogeno in azienda ma sono una parte importante del ciclo epidemiologico di *Salmonella* spp. e permettono il mantenimento del patogeno nell'allevamento. Le feci di topo infatti possono contaminare sia la lettiera, sia i mangimi sia l'acqua di bevanda (Henzler, 1992). Un'altra fonte sono gli insetti quali: mosche, blatte e scarafaggi che possono veicolare *Salmonella* spp. nell'allevamento sia come corpo vettori passivi (Goodwin, 1996). Alcune volte anche gli animali selvatici (quali i volatili selvatici e sinantropi) possono essere fonte di contagio per gli allevamenti. L'attuazione di misure di biosicurezza appropriate quali la presenza di adeguate reti antipassero riducono notevolmente il rischio del contatto tra animali selvatici e allevati.

6.3. Misure igieniche in fase di allevamento

La salute del consumatore è garantita dall'applicazione di misure igieniche in tutte le fasi di produzione delle uova da consumo, dall'allevamento dei riproduttori, all'incubatoio, all'allevamento della pollastra, alla deposizione delle galline ovaiole sino alla corretta distribuzione e vendita delle uova. Queste misure sono necessarie per produrre delle uova che rispettino i regolamenti comunitari in particolare i Regolamenti (CE) n° :

- 2073/2005 che stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari;
- 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene dei prodotti di origine animale;
- 589/2008 che reca le modalità di applicazione del Regolamento n°1234/2007 circa le norme di commercializzazione applicabili alle uova;
- 882/2004 relativo ai controlli ufficiali tesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere animale.

Le misure si basano su sistemi di prevenzione che vengono applicati nelle aziende e sono usati per determinare una riduzione dell'incidenza per *Salmonella* spp. Le misure igieniche si basano principalmente: sull'igienizzazione dei locali, sulla vaccinazione degli animali, sul controllo dei mangimi e sul controllo della salute, della mancanza di stati patologici, o della mancanza di portatori sani fra gli animali in entrata in azienda. Ovviamente le aziende dovranno effettuare anche dei test di autocontrollo per determinare lo stato sanitario dei propri animali anche durante il ciclo produttivo ed intraprendere azioni correttive nel caso siano registrate positività.

Igienizzazione locali

L'igienizzazione dei locali viene effettuata grazie all'utilizzo del vuoto sanitario, una tipologia di approccio che permette di organizzare la pulizia dei locali in maniera corretta e di mantenere alti standard igienici. Il vuoto sanitario si basa sulla presenza all'interno dei capannoni di animali tutti della stessa età che vengono rimpiazzati tutti nello stesso momento. La pulizia dei locali e delle attrezzature comincia nel momento precedente all'arrivo dei nuovi animali, tutti gli equipaggiamenti devono essere igienizzati, gli ambienti devono essere ripuliti dai residui di lettiera e da tutti i residui del precedente ciclo che potrebbero costituire una possibile fonte di contaminazione per il nuovo ciclo. Gli ambienti vengono quindi lavati con abbondante acqua

mescolata con detergenti e successivamente con antimicrobici per ridurre al minimo il rischio. Possono eventualmente essere utilizzate delle procedure di fumigazione che prevedono un trattamento con Formalina e Permanganato di Potassio (KMNO_4) ad una temperatura di 21.1°C (Dwight, 1998). Successivamente vengono applicati insetticidi e germicidi all'interno del capannone. Tutte le misure devono essere applicate in maniera corretta e successivamente alle stesse dovrebbero essere effettuate delle analisi da parte dei responsabili tese a verificare il corretto svolgimento delle procedure di sanificazione dei locali. L'avvenuta decontaminazione dovrà essere confermata da un controllo microbiologico ambientale, con almeno 5 tamponi ambientali (spugnette), da effettuarsi almeno 10 giorni prima dell'immissione dei nuovi gruppi.

Vaccinazione animali

La vaccinazione è una procedura che si basa sull'inoculazione negli animali di un antigene in grado di favorire lo sviluppo nell'organismo ospite di una risposta adattativa o di una resistenza nei confronti di un particolare patogeno. Nel caso di Salmonella la vaccinazione non è obbligatoria come da Regolamento (CE) n. 1177/2006, ma consentita, con l'eccezione dell'uso di vaccini vivi non distinguibili dai ceppi di campo. La vaccinazione è obbligatoria quale misura di controllo prevista per gli animali utilizzati per ripopolare un capannone che ospitava durante il ciclo precedente un gruppo positivo per *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium*. Lo schema di vaccinazione è scelto dal veterinario d'azienda. Tuttavia il Regolamento (CE) n°1177 del 2006 che applica il Reg. n°2160/2003 impone all'Art 3 che: i programmi di vaccinazione contro *S. Enteritidis* per la riduzione della contaminazione delle uova siano eseguiti, durante l'allevamento, su tutte le galline ovaiole al più tardi a partire dal 1 gennaio 2008 negli Stati membri, finché questi non dimostrino una prevalenza inferiore al 10 % sulla base dei risultati dello studio di riferimento.

Controllo dei mangimi e dell'acqua

Per il trattamento delle acque destinate agli avicoli sono utilizzati sia metodi chimici che si basano sull'addizione di cloro o di ammoniaca all'acqua sia metodi fisici che si basano sul trattamento delle acque con i raggi UV. Il cloro viene solitamente usato in concentrazione di 3-10 ppm ed è molto efficace. Il trattamento con i raggi UV invece viene effettuato tramite l'applicazione di lampade UV che trattano l'acqua prima dell'ingresso nel capannone. I mangimi dovrebbero essere controllati all'arrivo per appurare sia le condizioni di

conservazione degli stessi sia per inviare dei campioni ad analizzare per scongiurare il rischio di presenza di *Salmonella* spp. nel mangime. I mangimi dovrebbero sempre provenire da aziende di comprovata affidabilità e dovrebbero essere stoccati, in attesa dell'utilizzo, all'interno di locali o silos in cui le condizioni ambientali di temperatura e umidità fossero rigidamente controllate. I mangimi dovrebbero essere posti in locali chiusi, non accessibili ai visitatori e soprattutto dovrebbero essere messe in pratica delle misure per evitare l'ingresso di animali infestanti quali ad esempio roditori o insetti che potrebbero contaminare le derrate.

Procedure di autocontrollo per Salmonella in azienda

Il piano di autocontrollo aziendale per Salmonella entra a far parte delle misure igieniche in quanto permette la determinazione dello stato sanitario degli animali e quindi consente di intraprendere misure correttive. Il piano viene stilato dal responsabile dell'allevamento che deve fornire tutte le informazioni necessarie al riconoscimento dell'azienda, comprese le informazioni circa le strutture, il veterinario responsabile gli animali, le norme di biosicurezza, il mangime, il piano di campionamento, i nomi dei laboratori per l'esecuzione delle analisi e le misure in caso di positività. Il piano di autocontrollo deve essere presentato all'Autorità competente, che provvede alla sua approvazione, previa eventuale richiesta di modifiche o integrazioni.

I campionamenti sono effettuati sotto la guida del veterinario e avvengono in tutti gli allevamenti di galline ovaiole *Gallus Gallus* a carattere commerciale o con capacità superiore ai 250 capi. I campioni vengono prelevati da :

- pulcini di un giorno all'arrivo in allevamento;
- pollastre due settimane prima dell'entrata in deposizione;
- gruppi di ovaiole adulte almeno ogni 15 settimane, a cominciare da quando gli animali hanno in età di 24 ± 2 settimane.

I campioni vengono prelevati nel seguente modo: dai gruppi in gabbia devono essere prelevati due pool di feci fresche di 150 grammi l'uno, mentre dai gruppi allevati a terra le feci devono essere prelevate utilizzando almeno due paia di sovrascarpe per gruppo e comunque in numero tale da garantire la rappresentatività di tutta la superficie calpestabile.

6.4. Controlli sanitari nell'allevamento

I controlli ufficiali all'interno degli allevamenti sono la misura principale che viene utilizzata a livello nazionale per proteggere la salute del consumatore. I Regolamenti e le Direttive che li stabiliscono sono emanati dalla comunità europea e sono recepiti ed attuati a livello dei singoli stati membri. Lo S.M. delega l'attuazione di questi controlli a livello delle singole regioni che tramite le varie ULSS effettuano i controlli nelle aziende. Il Regolamento 882 del 2004 del Parlamento e della Commissione Europea tratta in particolare i controlli ufficiali tesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere animale

Reg. n° 882/2004 del Parlamento e della Commissione Europea

Questo regolamento stabilisce tutte le procedure che devono essere seguite dai Pubblici Ufficiali, durante i controlli ufficiali. In particolare tratta all' Articolo 4 la designazione dell'Autorità competente cui spetta il controllo e all'Articolo 5 la possibilità di delega dell'autorità nei confronti di organismi accreditati. I Controlli ufficiali vengono effettuati tramite l'utilizzo di meccanismi di Verifica, Ispezioni e Audit. Queste misure sono tese alla creazione di reti di monitoraggio che permettono di ottenere informazioni, che oltre ad essere utili per sanzionare le aziende che non rispettano le normative, permettono di creare statistiche basate sull'analisi del rischio.

Il regolamento 882 viene applicato basandosi sui Piani di controllo che vengono stabiliti dal Ministero della Salute in accordo con il Regolamento (CE) n°2160/2003 e il Regolamento (UE) n°517/2011 . In Italia è in vigore il Piano nazionale di controllo di *S. Enteritidis* e *S.Typhimurium* nelle ovaiole del 2012. Questo piano è composto da Prelievi ufficiali all'interno degli allevamenti che devono essere effettuati senza preavviso, con cadenze variabili e frequenza che si basa sulle precedenti analisi dell'allevamento stesso. La frequenza del controllo quindi viene definita dall'ULSS che, controllando i risultati dei precedenti campionamenti, mette in atto delle misure di intervento.

Piani di campionamento :

I piani di campionamento sono definiti in base al motivo del campionamento stesso :

1. controllo routinario (almeno un gruppo all'anno per azienda con almeno 1000 animali);

2. controllo gruppo di ovaiole dell'età di 24 ± 2 settimane ospitato in capannone in cui era stata isolata precedentemente *S.Enteritidis* e/o *S.Typhimurium*;
3. controllo in caso di sospetta infezione da *S.Enteritidis* e/o *S.Typhimurium* sulla base dell'indagine epidemiologica dei focolai di tossinfezione alimentare;
4. controllo su tutti gli altri gruppi dell'allevamento nel caso *S.Enteritidis* e/o *S.Typhimurium* siano state individuate in un gruppo dell'azienda;
5. controllo nel caso in cui l'Autorità Competente lo ritenga appropriato;
6. controllo di conferma a seguito di positività per *S.Enteritidis* e/o *S.Typhimurium* in autocontrollo;
7. controllo ambientale dell'avvenuta disinfezione dei locali a seguito di precedente positività per *S.Enteritidis* e/o *S.Typhimurium*.

Modalità di campionamento

Il campionamento deve essere effettuato nel modo più preciso e conforme alle normative possibile. Non deve compromettere il campione e deve essere sempre rappresentativo. Le procedure di campionamento devono essere effettuate da personale competente ed autorizzato e devono essere svolte nei tempi e nei numeri previsti.

La scheda di campionamento che deve essere compilata deve contenere tutte le informazioni circa il gruppo di animali campionati e deve essere conservata dal Servizio Veterinario per un minimo di tre anni insieme agli esiti di laboratorio.

La scheda quindi deve contenere informazioni circa gli animali campionati:

1. la data di prelievo;
2. i codici identificativi del capannone e del gruppo;
3. il numero di galline presenti nel gruppo e la loro età;
4. la data di accasamento;
5. la tipologia di allevamento (in gabbia, a terra, all'aperto, biologico);
6. l'utilizzo o meno di vaccini nel gruppo e la tipologia di vaccino usato;
7. l'utilizzo o meno degli antimicrobici (in caso di tamponi ambientali);
8. la data di ultima pulizia e disinfezione (in caso di tamponi ambientali).

Informazioni circa i campioni prelevati :

1. il tipo (Pool di feci fresche, Soprascarpe, Polvere, Ambientali, Altro);
2. il numero di campioni prelevati per tipo.

E informazioni circa gli esami richiesti.

Deve poi contenere tutte le informazioni circa l'allevamento che siano utili per identificare i responsabili dell'allevamento e i responsabili della gestione delle misure igieniche nell'azienda.

La scheda deve essere compilata in tutte le parti necessarie, firmata e timbrata (pena la non validità) e deve esserne rilasciata una copia al detentore dell'allevamento, mentre un'altra copia deve essere inviata all'autorità competente.

Misure da adottare in caso di positività

In caso di positività devono essere adottate delle misure preventive, utili a limitare il diffondersi del patogeno, sia da parte del produttore sia da parte del Servizio veterinario. Nel caso di un riscontro di positività (per Salmonelle differenti da *S.Enteritidis*/*S.Typhimurium*) all'interno di misure di autocontrollo o di ispezioni Ufficiali il responsabile dell'allevamento ed il laboratorio che ha effettuato l'analisi devono darne immediata comunicazione al Servizio Veterinario di competenza.

Nell'allevamento sono quindi applicate opportune misure sanitarie al fine di evitare o limitare la diffusione dell'infezione e deve essere effettuata, in collaborazione con il responsabile dell'allevamento e del veterinario aziendale, un'accurata indagine epidemiologica. Sulla base dei risultati della stessa indagine, i Servizi Veterinari possono decidere di intensificare la frequenza dei controlli ufficiali in allevamento al fine di verificare l'efficacia delle misure sanitarie adottate.

Nel caso invece di riscontro di sierotipi quali *S.Enteritidis*/*S.Typhimurium* a seguito di :

-campionamenti di autocontrollo : il responsabile dell'allevamento e il laboratorio devono darne immediata comunicazione al Servizio Veterinario che dichiara sospetto il gruppo e preleva un nuovo campione per conferma. Una volta dichiarato positivo dopo la conferma di laboratorio al gruppo vengono applicate le misure previste e di seguito riportate.

-campionamenti ufficiali : il gruppo è dichiarato positivo e le misure sono applicate direttamente.

Destino degli animali

Gli animali dei gruppi positivi per *S.Enteritidis*/*S.Typhimurium* sono soggetti al vincolo dell'A.S.L. e devono essere abbattuti e le carcasse distrutte ai sensi del Regolamento (CE) n° 1069/2009 oppure possono essere inviati alla macellazione mettendo in atto misure per prevenire il diffondersi dei batteri.

In accordo con il Regolamento (CE) 1237/2007 i gruppi di ovaiole positivi per sierotipi rilevanti le cui uova fossero destinate alla produzione di uova pastorizzate possono essere portate a fine ciclo ma le uova devono mantenere la stessa destinazione e devono essere attuate misure di controllo del gruppo positivo.

La macellazione dei gruppi positivi deve avvenire all'interno dei macelli autorizzati e deve essere effettuata a fine giornata in modo da separare correttamente la partita positiva dalle partite negative e devono essere applicate misure igieniche successive alla macellazione atte a igienizzare lo stabilimento. Le carni derivanti da gruppi positivi devono essere trattate termicamente.

Destino delle uova

Tutte le uova derivanti da gruppi positivi o gruppi sospetti positivi (in attesa di conferma) o di cui non si conosca lo stato sanitario devono essere considerate come uova di categoria B (uova non destinate al consumo alimentare diretto) ai sensi del Regolamento (CE) 589/2008 e non possono pervenire ai centri di imballaggio a meno che il Servizio Veterinario non ritenga idonee le misure applicate per evitare che le uova positive contaminino le altre uova dello stabilimento

7. Diffusione di *Salmonella* spp. negli allevamenti avicoli

Salmonella spp. è un microrganismo che causa malattie alimentari trasmesse all'uomo ed è una causa significativa di perdite economiche per l'allevamento avicolo. Le uova da consumo derivanti da allevamenti, infettate da *S. Enteritidis*, sono la più importante fonte di contagio, che causa fino al 50% delle infezioni umane da *Salmonella* nell'Unione Europea. Il secondo sierotipo responsabile di infezioni umane è *S. Typhimurium* che viene anch'esso quasi sempre associato al consumo di uova infette.

L'Unione Europea ha stilato un programma per determinare una riduzione della prevalenza di *Salmonella* negli allevamenti animali, in particolare quelli avicoli e quelli che allevano i suini, e quindi per determinare un miglioramento della salute pubblica (Reg.(CE) n°2160/2003 e n°517/2011). Per il corretto funzionamento del programma sono stati effettuati degli studi da parte dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare a livello di allevamenti avicoli. La presente tesi, in particolare, prende in considerazione i dati riguardanti la presenza del patogeno negli allevamenti della gallina ovaiole in Europa.

7.1. Studio dell'EFSA su *Salmonella* spp. negli allevamenti di galline ovaiole europee

Nel presente paragrafo verranno riportati i dati relative al *Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus* (EFSA, 2007).

Tale studio aveva come obiettivi principali:

- la stima della presenza di *Salmonella* spp. negli allevamenti intensivi, sia a livello di U.E. sia a livello di singoli stati membri (SM);
- la stima dei sierotipi prevalenti, per determinare i tre sierotipi su cui concentrare gli sforzi di riduzione;

- lo studio dei fattori associati ai sierotipi e la determinazione dei fattori che più spesso all'interno della Comunità Europea determinano un aumento della presenza di *Salmonella* spp.

Questo studio è basato sul campionamento casuale di un numero variabile di allevamenti a livello di singoli stati membri, i campioni analizzati e confermati dall'EFSA sono poi stati comparati per compilare un rapporto finale da parte della Commissione Europea.

Prelievo campioni

In ogni allevamento selezionato è stato scelto un gruppo di animali (superiore a 1.000 esemplari) da sottoporre ai test, da questo gruppo sono stati prelevati: cinque campioni di feci indistinte, cinque coppie di tamponi ambientali e due campioni di lettiera. Il numero degli allevamenti selezionati per singolo SM è stato valutato basandosi sull'effettiva produzione zootecnica degli stati. I campioni sono stati prelevati da personale dell'Autorità Competente di ogni stato e sono stati testati dai Laboratori Nazionali di Riferimento, usando la metodica ISO 6579.

Controllo dei dati

Il controllo dei dati effettuato dall'EFSA si è basato sui risultati di laboratorio ricevuti dagli stati membri e dalla Norvegia che si è offerta di partecipare al test. I dati derivavano da 5.351 allevamenti dei 24 SM e da 314 allevamenti Norvegesi. Il controllo è stato effettuato utilizzando un set di dati di esclusione, utile per identificare informazioni non valide o non plausibili all'interno dei dati forniti. Le informazioni ottenute dopo l'eliminazione dei dati, comprendevano 5.310 allevamenti in cui le procedure di campionamento ed analisi sono state effettuate correttamente.

7.1.1 Prevalenza di *Salmonella* spp. osservata nella Comunità Europea

La presenza di *Salmonella* spp. nella Comunità Europea e a livello di singoli stati membri rapportata al numero di allevamenti testati è visibile in Tabella 6. Il microrganismo è stato riscontrato in 1.486 allevamenti, con una prevalenza del 30.8%. Il range di positività è però molto variabile, dallo 0% del Lussemburgo e Svezia a circa il 79.5% del Portogallo. Si può quindi asserire che la prevalenza totale osservata nella Comunità Europea non sia un buon indicatore delle prevalenze dei singoli stati membri che spesso si presentano minori o molto superiori. C'è però da considerare come il presente studio si è basato sul test di un singolo gruppo di animali all'interno dell'allevamento e questo può aver portato a sottostimare la prevalenza di *Salmonella* in quanto

alcuni allevamenti potrebbero essere stati classificati come negativi per *Salmonella* spp. anche se in realtà potrebbero essere stati infetti. Il numero di campioni positivi riscontrati per ogni gruppo variava fra uno e sette ma il 30.8% degli allevamenti risultava positivo per uno o due campioni.

Tabella 6. Positività per *Salmonella* spp. nell'unione europea (EFSA, 2007)

	N	<i>Salmonella</i> spp.	
		% pos	CI 95% ^a
Austria	337	15.4	12.7 - 18.5
Belgium	141	37.6	31.4 - 44.1
Cyprus	25	28.0	21.7 - 33.0
Czech Republic	64	65.6	61.3 - 68.2
Denmark	185	2.7	1.6 - 4.3
Estonia	11	18.2	- ^b
Finland	250	0.4	0.0 - 1.6
France	511	17.2	14.6 - 20.2
Germany	553	28.9	25.7 - 32.3
Greece	140	49.3	42.8 - 55.5
Hungary	267	43.8	39.9 - 47.6
Ireland	146	1.4	0.6 - 2.6
Italy	367	29.2	25.4 - 33.1
Latvia	6	16.7	1.0 - 46.8
Lithuania	9	44.4	22.6 - 62.9
Luxembourg	9	0.0	-
Poland	328	76.2	72.0 - 79.9
Portugal	44	79.5	66.7 - 87.7
Slovenia	98	19.4	15.4 - 23.8
Spain	485	73.2	70.1 - 76.0
Sweden	168	0.0	0.0 - 1.3
The Netherlands	409	15.4	12.6 - 18.6
The United Kingdom	454	11.9	9.9 - 14.7
EU ^c	5,007	29.7	
EU weighted prevalence		30.8	29.8 - 31.8
Norway	303	0.0	0.0 - 0.8

7.1.2. Sierotipi e fattori associati alla positività

Dallo studio dei dati forniti dall'EFSA si evince che il sierotipo più riscontrato negli allevamenti di gallina ovaiole europei è *S.Enteritidis*, anche se la frequenza del suo isolamento è estremamente variabile all'interno dei vari stati. Si può osservare una varietà di isolamento molto grande anche all'interno degli altri due sierotipi più isolati (*S.Typhimurium* e *S.Infantis*). La presenza di *S.Enteritidis* è dovuta alla sua capacità di colonizzare per lungo tempo l'ovaio e l'ovidutto delle galline ovaiole e la capacità di persistere sia nell'ambiente anche dopo il vuoto sanitario, sia negli animali infestanti quali i roditori.

Questi tre sierotipi sono i principali responsabili delle infezioni umane da *Salmonella* spp. infatti rappresentano rispettivamente il 52.2%, 9.1%, e 0.8% dei sierotipi isolati nell'uomo all'interno

della U.E. nel 2005. La distribuzione dei sierotipi osservati e i casi di infezione umana presentano molte similitudini, ma bisogna specificare che questi sierotipi sono molto presenti anche nelle altre specie di interesse produttivo come suini, tacchini e vacche da latte, che quindi possono rappresentare altre fonti di contagio.

7.1.2.1. S.Enteritidis

I singoli stati membri sono stati divisi in tre gruppi basandosi sulla presenza percentuale di *S. Enteritidis* :

1. SM con positività inferiore al 2,5%;
2. SM con positività superiori al 2,5% ma inferiori al 15%;
3. SM con positività superiore al 15%.

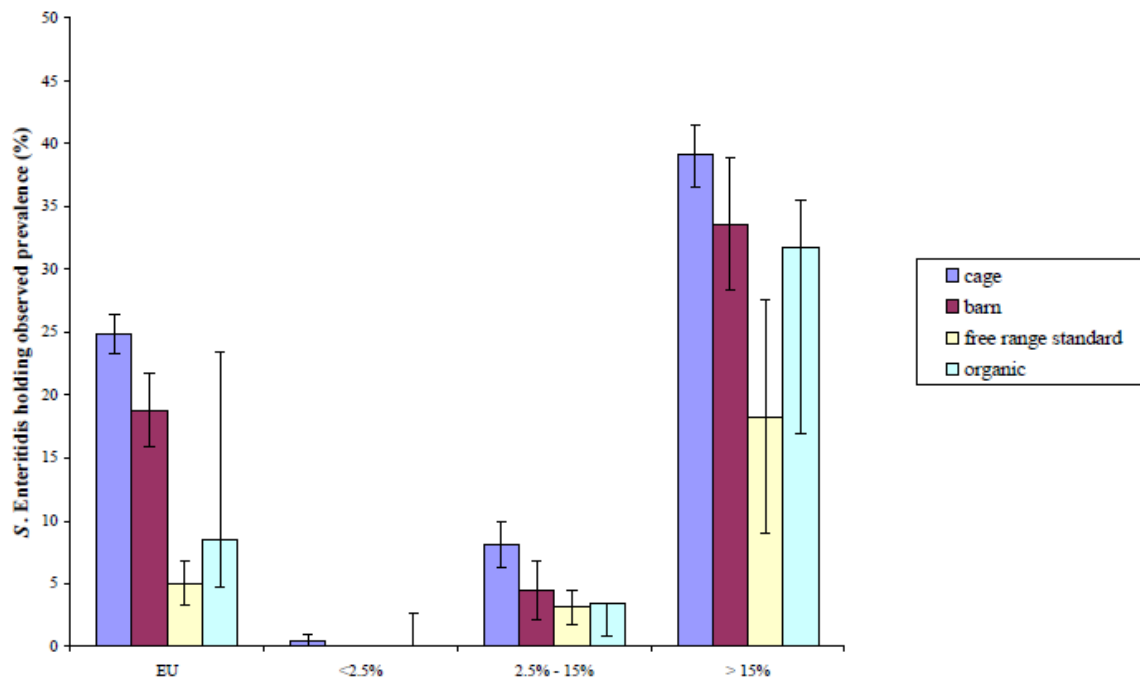
Questa divisione in gruppi è stata utile per effettuare una analisi sui fattori associati alla presenza del microrganismo negli allevamenti di gallina ovaioia. I fattori che sono stati considerati sono quattro:

- la tipologia di allevamento;
- il numero i capi per allevamento;
- l'utilizzo della vaccinazione;
- la tipologia di campione dal quale è stato effettuato l'isolamento.

Tipologia di allevamento

La figura 7 mostra il rapporto fra la tipologia di allevamento e la positività per *S.Enteritidis*. A livello di comunità europea si può notare come l'allevamento della gallina ovaioia in gabbia sia associato ad un aumento del rischio di positività per *S.Enteritidis* se paragonato all'allevamento in capannone a terra, all'aperto e biologico. Il divario maggiore si osserva negli stati membri con positività superiori al 15% , dove fra allevamento in gabbia e allevamento all'aperto, la prevalenza può passare dal 20% al 40%. In questi SM anche l'allevamento biologico risulta essere molto colpito da *Salmonella* toccare con prevalenze che possono arrivare al 32-35%.

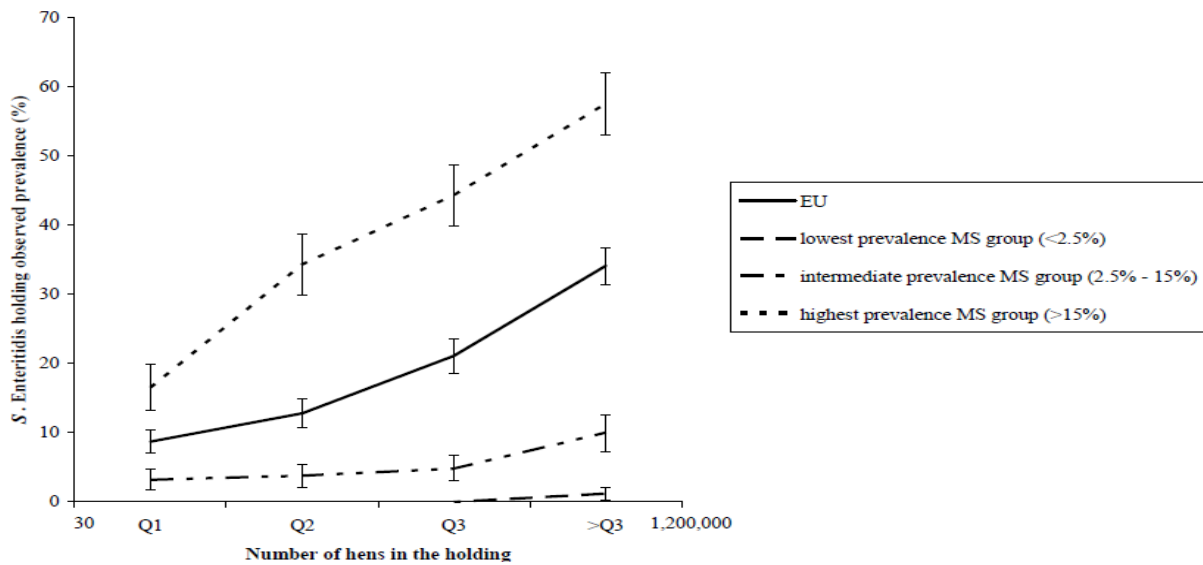
Figura 7. Tipologie di allevamento e positività per Salmonella Enteritidis (EFSA, 2007)



Numero di capi per allevamento

La Figura 8 mostra le positività per *S. Enteritidis* rapportate al numero di capi nell'allevamento. Per semplicità i capi sono stati divisi in quartili, il primo rappresenta gli allevamenti con meno di 3.000 capi, il secondo quegli allevamenti con meno di 8.000 animali e il terzo quello con meno di 23.000 capi. Si può vedere come, soprattutto negli allevamenti con numero elevato di capi, si possa riscontrare una positività di molto maggiore rispetto a quegli allevamenti che hanno pochi capi. Questi grandi allevamenti utilizzano principalmente le gabbie, sembra quindi essere l'associazione fra l'utilizzo delle gabbie e la presenza di un gran numero di animali a creare le condizioni migliori per lo sviluppo di infezioni da *S. Enteritidis*. Queste migliori condizioni sono garantite sia dalla difficoltà di pulizia degli allevamenti in gabbia sia dalle difficoltà di controllo del gran numero di animali che entrano nell'allevamento.

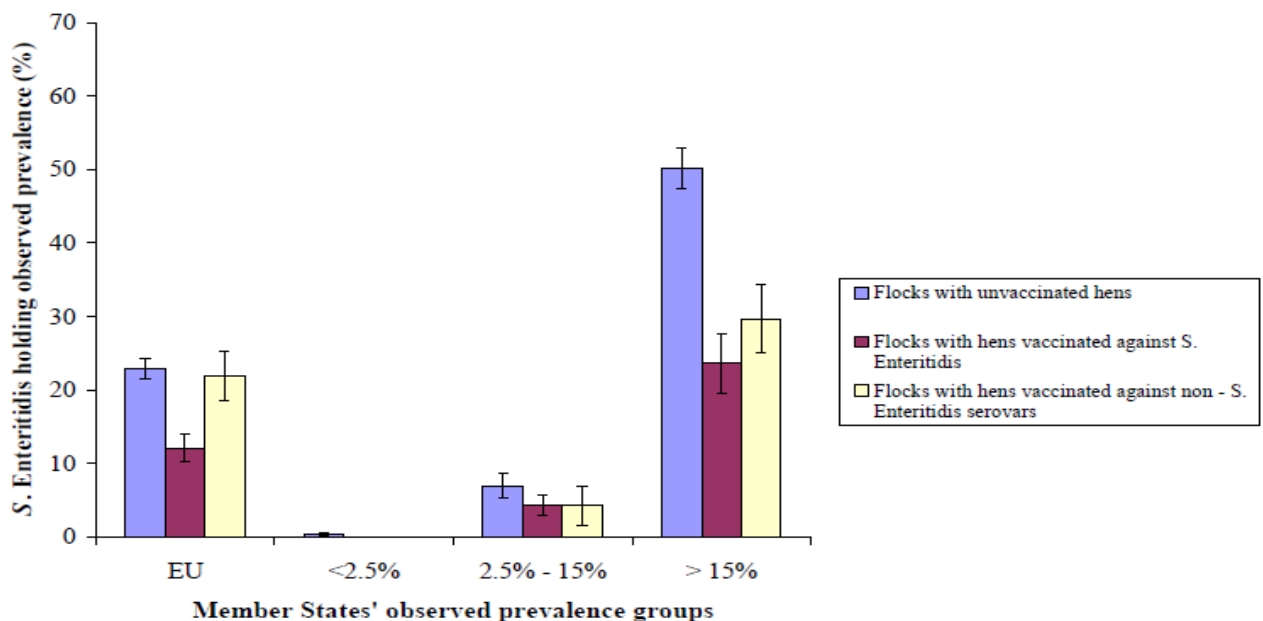
Figura 8. Numero di capi e positività per Salmonella Enteritidis (EFSA, 2007)



Utilizzo della vaccinazione

La figura 9 mostra l'utilizzo, come strumento di controllo, della vaccinazione rapportato alla positività per Salmonella Enteritidis. L'utilizzo della vaccinazione sembra essere il parametro che più influisce sullo stato di salute degli animali. Infatti fra il gruppo dei vaccinati per S. Enteritidis e il gruppo dei non vaccinati l'aumento di positività è di circa il 30%.

Figura 9. Utilizzo della vaccinazione e positività per S. Enteritidis nell'allevamento della gallina ovaia (EFSA, 2007)



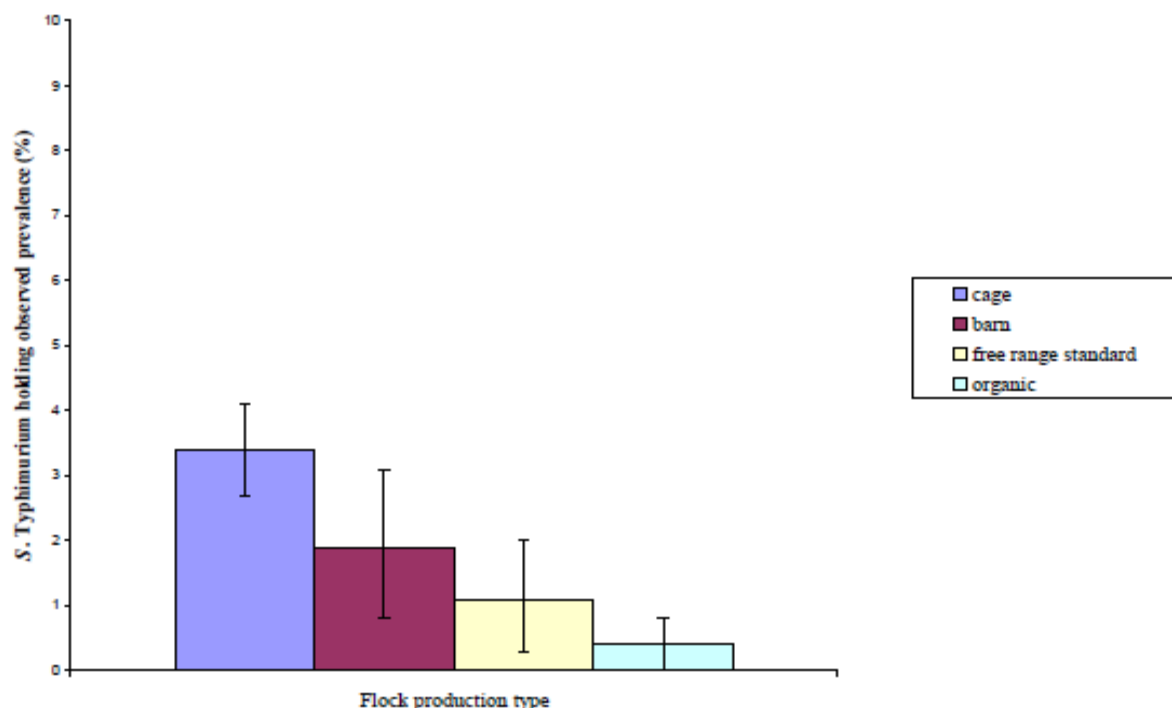
Tipologia del campione utilizzato per l'isolamento

E' stata riscontrata una positività maggiore nei campioni ambientali e di polvere rispetto ai campioni fecali. Questo fatto può essere spiegato dalla capacità di *Salmonella* spp. di resistere per lungo tempo in condizioni di sviluppo non ottimali e dalla possibilità di aver campionato dei campioni fecali non rappresentativi o non infetti.

7.1.2.2. *S. Typhimurium*

Essendo stata isolata solo nel 9.1% dei casi, *S. Typhimurium*, l'EFSA non ha posto particolare attenzione per tale sierotipo; infatti non sono state condotte le stesse analisi eseguite sulle positività da *S. Enteritidis*. Per *S. Typhimurium* sono stati analizzati tutti gli stati europei che hanno mostrato almeno un gruppo positivo. I dati raccolti derivavano da 15 stati membri ed erano stati ottenuti dal prelievo di 24.766 campioni in 3.583 allevamenti. La tipologia di allevamento è risultato essere l'unico fattore fortemente associato alla positività per *S. Typhimurium* (Figura 10).

Figura 10. Tipologie di allevamento e positività per *S. Typhimurium* negli allevamenti di galline ovaiole (EFSA, 2007)



Come per *S. Enteritidis*, le maggiori prevalenze per *S. Typhimurium* sono state osservate produzioni negli allevamenti in gabbia.

7.2. Report EFSA: prevalenza di *Salmonella* spp. negli allevamenti di galline ovaiole dal 2004 al 2010 in UE

Gli studi trattati riguardano le positività riscontrate negli allevamenti di galline ovaiole della comunità europea negli anni 2004/2010. In particolare i dati qui riportati sono stati presi da due report EFSA: *Scientific Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection and Statistical analysis of temporal and spatial trends of zoonotic agents in animals and food* (EFSA, 2009) e *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009* (EFSA, 2011). Le analisi statistiche sono state effettuate da un gruppo di esperti dell'EFSA, e in tutti e due i casi si sono basate su dati ottenuti tramite i sistemi di sorveglianza e comunicazione degli SM. I dati che sono stati forniti all'EFSA si basavano su procedure standardizzate a livello europeo e hanno permesso di ottenere dei risultati comparabili e di buona qualità.

Per entrambi gli studi, i campionamenti sono stati effettuati in due fasi differenti della produzione, in un primo momento, quando i pulcini "adulti" sono stati spostati alla fase di produzione e poi ogni quindici settimane fino alla fine del ciclo produttivo. Ovviamente i gruppi di animali che sono risultati positivi in una prima procedura di campionamento sono stati inseriti una volta soltanto nella compilazione dei risultati. I risultati dei test sono poi stati comunicati all'EFSA.

I controlli ufficiali delle autorità competenti sono stati svolti negli allevamenti che contenessero almeno mille capi e ogni gruppo è stato valutato come singolo. All'interno dei controlli ufficiali sono poi stati eseguiti dei campionamenti su sospetto (positività precedente di un allevamento, positività di altri gruppi di animali nell'allevamento e in tutti i casi in cui l'Autorità Competente lo ritenesse necessario) Per ogni Stato è stato calcolato :

- _ il numero di allevamenti positivi per *S. Enteritidis*/*S. Typhimurium*;
- _ il numero di allevamenti positivi per *Salmonella* spp.;
- _ il numero totale di allevamenti campionati.

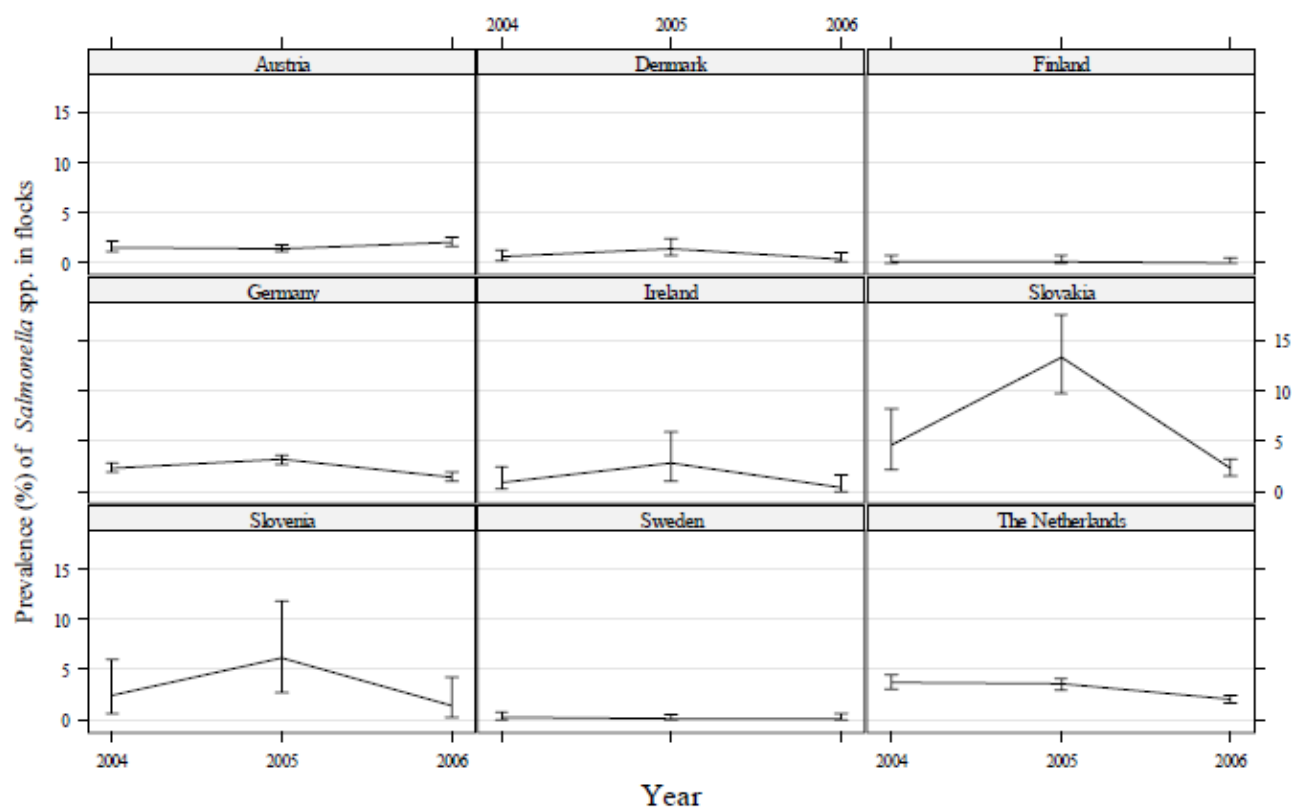
I controlli effettuati nelle aziende invece sono stati svolti senza distinzione del numero dei capi.

7.2.1. Analisi statistica dei trend di riscontro per *Salmonella* spp. anni 2004-2006

L'Autorità Europea per la sicurezza alimentare è stata designata come organo deputato all'analisi statistica nei confronti delle zoonosi all'interno della Comunità Europea. Le analisi statistiche sono cominciate nel 2006 con l'obiettivo di valutare le variazioni nella prevalenza degli agenti zoonotici nella U.E. I dati raccolti negli anni precedenti al 2006 sono stati poi molto utili per la valutazione all'interno dei vari Stati membri dell'efficacia delle misure attuate per il controllo di tali patogeni. A partire dal 12 aprile del 2004 grazie alla Direttiva n° 99/2003 della Comunità Europea le informazioni sulle zoonosi e gli agenti zoonotici devono essere comunicate alla Commissione Europea. Tuttavia le informazioni risultavano nei primi anni specialmente per *Salmonella* spp. abbastanza discordanti ed è stato possibile analizzare solo i dati ricevuti da nove Stati Membri. In certi casi infatti le misure di campionamento e di analisi non erano perfettamente armonizzate e i dati ricavati non potevano essere utilizzati per le analisi statistiche.

In Figura 11 vengono riportate le positività per *Salmonella* spp. negli allevamenti di galline ovaiole.

Figura 11. Positività per *Salmonella* spp. fra il 2004 e il 2006 suddivisa per Stato Membro (EFSA, 2009)

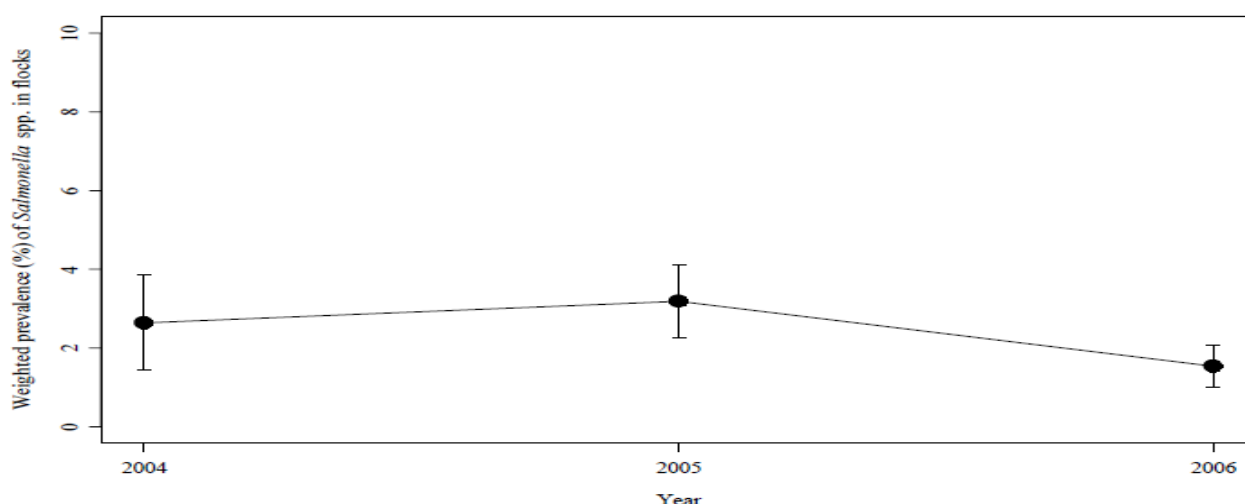


Si può osservare come i valori di positività negli anni tendano a diminuire per sei stati membri su

nove, segno che le misure di igiene e profilassi applicate a livello di allevamento in quegli stati sono risultate essere efficaci. Mentre è possibile notare come in Germania la positività sia aumentata nel 2006 rispetto al 2004. Finlandia e Svezia tendono invece a mantenere delle positività molto basse. È possibile notare inoltre come per Irlanda, Slovenia e Slovacchia i valori abbiano subito un'impennata nel 2005, raddoppiando le positività per la Slovenia (da 2.5% a quasi il 6%) e passando dal 2,5% al 13.5% per la Slovacchia.

La figura 12 invece mostra una rappresentazione della positività media degli stati analizzati ottenuta rapportando le positività dei vari stati membri al numero totale delle unità campionate.

Figura 12. Positività per *Salmonella* spp. fra il 2004 e il 2006 in U.E. (EFSA, 2009)



Si può osservare come vi sia una riduzione media dei riscontri di positività, però è da sottolineare come questo trend mostri però i riscontri di soli nove stati membri e permetta di evidenziare una prevalenza inferiore al 2%. Questo dato non può però considerarsi rappresentativo della situazione europea, in quanto il campione non è rappresentativo essendo composto solo da 1/3 degli Stati membri. La prevalenza infatti è da considerarsi maggiore, osservando il fatto che la prevalenza media Europea nel 2008 si attestava a circa il 5.9% per *Salmonella* spp.

7.2.2. Analisi statistica dei trend di riscontro per *Salmonella* spp. anni 2008-2010

L'analisi dei dati di prevalenza per *Salmonella* spp. relativi agli anni 2008-2010 è stata di cruciale importanza per la Comunità Europea in quanto non ha fornito solo dati relativamente alla percentuale di allevamenti positivi ma ha permesso anche di ottenere dati circa l'efficacia dei

piani di riduzione per *Salmonella* spp. a livello europeo. Alla fine del periodo del test 27 Stati membri hanno rilasciato dati compatibili con il programma, ogni gruppo di animali è stato considerato positivo se uno o più di un campione risultavano positivi. La prevalenza di *Salmonella* spp. e di *S. Enteritidis*/*S. Typhimurium* nei vari stati della Comunità Europea è mostrata in Tabella 7. E' possibile osservare come i piani di controllo di Austria, Francia, Germania, Olanda, Polonia e Regno Unito comportino l'analisi di un gran numero di allevamenti, superiore a 2.000. Analizzando questa tabella si può notare come negli anni il numero di riscontri di positività per i due sierotipi *S. Enteritidis*/*S. Typhimurium* in totale in U.E. sia sostanzialmente diminuito passando dal 3.5% nel 2008 al 3.2% nel 2009 al 1.9% nel 2010. Solo tre stati membri (Cipro, Romania e Malta) hanno riportato un aumento rispetto al 2009 che comunque è nell'ordine dello 0.1%, mentre il Regno Unito ha riscontrato le stesse positività del 2009. La prevalenza complessiva di *Salmonella* spp. invece ha mostrato un aumento nel 2009 passando dal 5.9% del 2008 al 6.7% del 2009 ma è comunque ritornata negli standard nel 2010 al 5.9%. Gli stati con più alto tasso di positività sono risultati essere, negli anni 2008-2010: la Spagna, la Romania (40.2% nel 2010 e 30.6% nel 2009) e Malta che è passata dal 41.7% del 2009 al 66.1% del 2010.

Tabella 7. Prevalenza di *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* nella Comunità Europea fra il 2008 e il 2010 in allevamenti di galline ovaiole (EFSA, 2012)

Country	2010								2009			2008		
	N	Target (production period)	% positive						N	% positive		N	% positive	
			pos (all)	S. Enteritidis and/or S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Typhimurium	Other serovars, non-typeable, and unspecified	pos (all)		S. Enteritidis and/or S. Typhimurium	pos (all)		S. Enteritidis and/or S. Typhimurium	
Austria ¹	2,808	2.3	2.1	1.2	0.8	0.4	1.0	2,578	3.3	2.5	1,966	2.5	1.4	
Belgium ²	810	3.4	6.8	3.2	3.0	0.2	3.6	763	7.1	3.8	649	11.7	3.7	
Bulgaria ³	272	8.0	4.8	1.1	1.1	0	3.7	101	19.8	8.9	119	0	0	
Cyprus	63	3.9	19.0	4.8	4.8	0	14.3	92	17.4	4.3	40	12.5	0	
Czech Republic	441	8.7	3.2	2.3	2.3	0	0.9	467	12.8	10.9	449	8.9	7.6	
Denmark	455	2.0	1.8	1.1	0.9	0.2	0.7	454	1.8	1.8	508	0.6	0.4	
Estonia ⁵	32	3.1	0	0	0	0	0	48	0	0	52	7.7	1.9	
Finland	899	2.0	0	0	0	0	0	900	3.2	0.2	950	0.1	0.1	
France ⁸	4,013	2.0	6.7	1.8	1.2	0.6	4.9	3,657	4.8	2.0	3,067	6.1	3.2	
Germany	4,247	4.3	2.6	1.9	1.7	0.2	0.7	4,399	6.6	4.8	6,304	3.5	2.7	
Greece ⁷	554	3.0	9.4	1.8	1.1	0.7	9.6	327	12.5	3.4	112	31.3	14.3	
Hungary	1,256	3.4	5.4	2.1	1.5	0.6	3.3	887	8.9	3.8	866	11.7	8.7	
Ireland	239	2.0	0.4	0	0	0	0.4	375	0.3	0	326	0.9	0.3	
Italy	926	5.1	15.4	2.6	2.4	0.2	12.9	921	17.9	5.6	821	20.5	6.8	
Latvia ⁴	68	8.9	4.4	2.9	2.9	0	1.5	71	9.9	9.9	69	20.3	14.5	
Lithuania ⁶	16	5.6	6.3	6.3	6.3	0	0	81	6.2	6.2	13	0	0	
Luxembourg ⁵	100	2.0	0	0	0	0	0	7	0	0	7	14.3	14.3	
Malta	121	2.0	66.1	13.2	9.9	3.3	52.9	48	41.7	0	-	-	-	
Netherlands	2,411	2.0	-	1.1	1.1	0	-	2,240	-	1.5	2,346	2.6	2.6	
Poland ⁵	2,275	8.4	7.0	4.5	4.1	0.4	2.5	1,718	12.9	9.4	1,533	12.5	10.6	
Portugal	262	5.7	8.4	2.3	1.9	0.4	6.1	251	18.3	6.4	227	31.7	10.6	
Romania	393	2.0	40.2	0.8	0.8	0	39.4	420	1.4	0.2	-	-	-	
Slovakia	158	5.9	0.6	0.6	0.6	0	0	155	8.4	6.5	138	7.2	7.2	
Slovenia	202	3.0	4.5	0.5	0.5	0	4.0	209	9.1	3.3	172	10.5	8.7	
Spain	1,503	6.5	30.6	5.9	5.4	0.5	24.7	1,511	29.2	7.2	845	34.9	15.6	
Sweden	614	2.0	0.3	0	0	0	0.3	904	0.3	0.1	724	0.7	0.4	
United Kingdom	4,368	2.0	1.1	0.3	0.1	0.1	0.8	4,466	1.7	0.3	5,523	1.2	1.0	
EU Total	29,506		5.9	1.9	1.6	0.3	4.2	28,050	6.7	3.2	27,826	5.9	3.5	

7.2.2.1. Obbiettivi di riduzione per *S.Enteritidis*/*S.Typhimurium*

Per garantire la salute del consumatore le autorità deputate all'analisi del rischio a livello europeo e nazionale hanno fissato come obiettivo la riduzione della prevalenza di *S.Enteritidis*/*S.Typhimurium* nelle galline ovaiole. Le misure intraprese sono state differenziate nei singoli stati membri secondo il Regolamento (CE) n° 1168/2006. Sono quindi stati istituiti degli obblighi da rispettare:

- 1) una riduzione percentuale minima annua dei gruppi positivi di ovaiole adulte pari almeno a:
 - 10% se la prevalenza dell'anno precedente era inferiore al 10%;
 - 20% se la prevalenza dell'anno precedente era tra il 10 e il 19%;
 - 30% se la prevalenza dell'anno precedente era tra il 20 e il 39%;
 - 40% se la prevalenza dell'anno precedente era uguale o superiore al 40%;

oppure:

- 2) una riduzione della percentuale massima al 2% o ad un livello inferiore, per gli stati membri con meno di 50 gruppi di ovaiole adulte, a condizione che non rimanga positivo più di un gruppo adulto.

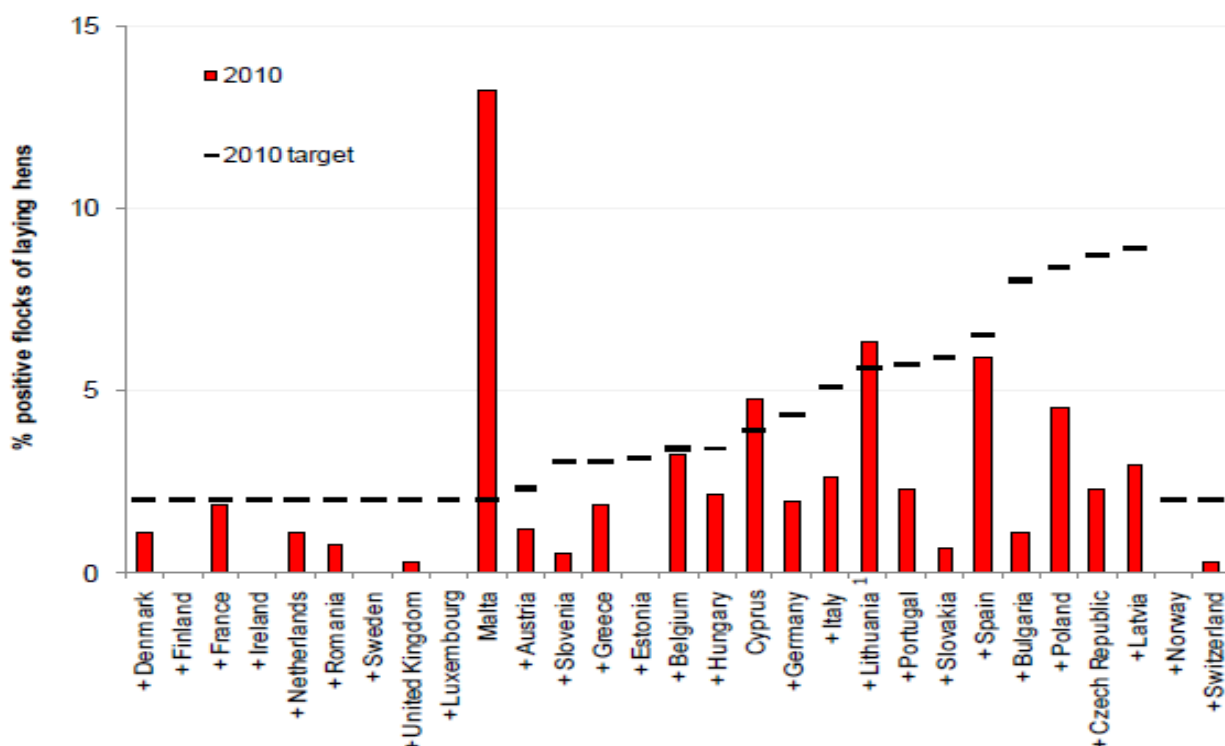
Gli Stati membri hanno intrapreso quindi una serie di azioni per ridurre la prevalenza nelle galline ovaiole al fine di conseguire gli obiettivi annuali di riduzione fissati. Per quanto concerne la segnalazione annuale delle zoonosi, gli Stati membri hanno trasmesso all'EFSA dati sulla prevalenza di *Salmonella* spp. e sugli altri due sierotipi. L'EFSA ha analizzato i dati raccolti dagli Stati membri, concludendo che, nel 2009, 17 Stati avevano conseguito l'obiettivo di riduzione.

Ogni S.M. della Comunità Europea ha dovuto mettere in atto un programma di controllo nei confronti di *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* per gli allevamenti di galline ovaiole. I piani di controllo si basano su campionamenti ufficiali svolti dalle autorità competenti e su controlli effettuati dagli allevatori stessi.

La Figura 13 mostra i risultati ottenuti nel 2010 dai vari stati europei rispetto ai target di riduzione che erano stati fissati dall'EFSA (percentuale di riduzione annuale minima nel numero di gruppi di galline ovaiole positive rispetto all'anno precedente) e permette di visualizzare come solo tre stati membri (Malta, Cipro e Lituania) non siano riusciti a migliorare i propri risultati e si può anche notare come questi stati membri abbiano mostrato l'incapacità di testare un largo numero di allevamenti (EFSA, 2012). I target di riduzione sono valutati basandosi sui dati dell'anno

precedente. Nel momento in cui tutti gli stati avessero raggiunto gli obbiettivi verranno stilati degli altri obbiettivi dalla Comunità Europea tesi all'aumento della sicurezza e della salute del consumatore.

Figura 13. Percentuale di allevamenti di galline ovaiole positivi per *S. Enteritidis*/*S. Typhimurium* nel 2010 rispetto agli obbiettivi di riduzione prefissati (EFSA, 2012).



7.3. *Salmonella* spp. negli allevamenti di gallina ovaiole extraeuropei

Il controllo e la presenza di *Salmonella* spp. negli allevamenti avicoli a livello mondiale è una materia estremamente complessa. Infatti esistono dati molto discordanti e soprattutto non esiste un ente internazionale preposto al monitoraggio come invece avviene per la Comunità Europea. La mancanza di un'Autorità "centrale" in questa materia fa sì che i dati disponibili siano basati su studi condotti in maniera non sempre uniforme e che prendono in considerazione solo uno stato o una porzione di questo. A titolo di esempio, verranno riportati i dati relativi alla presenza di *Salmonella* spp. tratti da due studi condotti negli Stati Uniti d'America e in Turchia.

S.Enteritidis , negli Stati Uniti d'America

Lo studio è stato condotto dal National Animal Health Monitoring System (NAHMS) un organo del Dipartimento dell'Agricoltura Americano che valuta le condizioni sanitarie degli allevamenti ed i rischi associati alle zoonosi in America. I dati di questo studio sono stati ricavati dalla consultazione del Web e dai campionamenti condotti dal NAHMS, dall'USDA National Agricultural Statistics Services e dalla Pennsylvania SE Pilot Project. Questi dati sono stati analizzati stato per stato al fine di ricavare dei dati che potessero dare informazioni circa la prevalenza complessiva degli Stati Uniti d'America.

In questo studio sono stati considerati positivi tutti i gruppi di animali per cui è stato rinvenuto almeno un campione positivo assumendo quindi che all'interno del gruppo vi fosse almeno una gallina positiva.

Un primo dato interessante da riportare è l'estrema variabilità della prevalenza tra gli stati questo è dovuto in particolar modo alle differenze climatiche (temperature e umidità) e alle modalità di allevamento diverse tra i singoli stati..

Lo studio ha analizzato 15 stati che sono stati divisi in base alle regioni geografiche in: regione dei grandi laghi, sud-est, centro ed ovest. Questi campioni sono stati raccolti durante l'anno 1999 in circa 200 grandi allevamenti che rappresentano l'82% degli allevamenti totali americani. Da questo dato è possibile osservare come la tendenza Americana nelle misure di allevamento sia quella di concentrare la produzione in grossi stabilimenti, rispetto alla tendenza Europea che comunque mantiene allevamenti di piccole dimensioni sul territorio.

La tabella 8 mostra in particolare i valori di positività riscontrati negli allevamenti americani.

Si può notare come le maggiori percentuali di positività siano state riscontrate nella regione dei Grandi laghi e come in questa regione si tenda a concentrare fino al 35% del patrimonio avicolo nazionale. I valori di positività maggiori sono probabilmente dovuti sia alle condizioni climatiche sfavorevoli rispetto alle altre regioni sia sicuramente alla concentrazione nella regione di un così alto numero di volatili.

Tabella 8. Prevalenza di *Salmonella* Enteritidis negli allevamenti di galline ovaiole negli USA suddivisi a seconda della localizzazione geografica (NAHMS, 1999)

Region	% Flocks SE-positive	% U.S. Flocks In Region
Great Lakes	17.2 (13.7)	35%
Southeast	0.0 (--)	15%
Central	9.0 (7.2)	28%
West	4.4 (2.5)	22%
Total	9.6 (5.2)	N/A

S. Enteritidis, in Turchia

Lo studio preso in esame ha previsto l'utilizzo di metodiche ISO (ISO 6579/2002) e della Real Time PCR (rPCR) per l'isolamento e la caratterizzazione di *Salmonella* da campioni clinici provenienti da 50 allevamenti. In totale sono stati campionati 175 tamponi cloacali, 14 intestini, 35 tamponi del ventriglio e 35 tamponi cecali. L'utilizzo di campioni clinici direttamente prelevati da un animale, sebbene comporti il sacrificio dell'animale stesso, è da considerarsi una procedura di campionamento più precisa rispetto al campionamento effettuato con tamponi ambientali. Basti pensare al fatto che un campione ambientale fecale è solitamente composto da feci aggregate di più animali e quindi non permette di determinare con assoluta precisione gli animali infetti ma solo la presenza dell'infezione, mentre un campione clinico permette direttamente di valutare lo stato di salute degli animali senza incorrere in possibili falsi positivi che possono invece incorrere in un campionamento ambientale. I risultati dello studio sono riportati in tabella 9.

Tabella 9. Prevalenza di *Salmonella* Enteritidis in allevamenti di galline ovaiole in Turchia (Temelli *et al.*, 2010)

Sample type and company code	Number of pooled samples	Number of positive samples by methods (%)		<i>Salmonella</i> Enteritidis incidence in culture-positive samples (%)	
		rPCR	Culture	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Non- <i>Salmonella</i> Enteritidis
Cloacal swab	175	87 (49.7)	75 (42.9)	49 (65.3)	26 (34.7)
I	37	3 (8.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
II	28	28 (100.0)	24 (85.7)	12 (50.0)	12 (50.0)
III	35	31 (88.6)	31 (88.6)	26 (83.9)	5 (16.1)
IV	36	24 (66.7)	19 (52.8)	10 (52.6)	9 (47.4)
V	28	1 (3.6)	1 (3.6)	1 (100.0)	0 (0.0)
VI	11	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Intestine	14	13 (92.9)	14 (100.0)	7 (50.0)	7 (50.0)
II	7	6 (85.7)	7 (100.0)	4 (57.1)	3 (42.9)
III	7	7 (100.0)	7 (100.0)	3 (42.9)	4 (57.1)
Gizzard swab					
III	35	26 (74.3)	23 (65.7)	17 (73.9)	6 (26.1)
Cecal swab					
III	35	32 (91.4)	32 (91.4)	28 (87.5)	4 (12.5)
Total	259	158 (61.0)	144 (55.6)	101 (70.1)	43 (29.9)

La prevalenza per *Salmonella* spp. osservata è stata elevata infatti risultavano positivi alla rPCR 158 campioni su 259 mentre all'isolamento erano positivi 144 su 259 campioni con prevalenze del 61.0% e 55.6% rispettivamente. Il campione che ha mostrato le maggiori positività è risultato essere il campione di intestini. E' risultato essere positivo nel 100% dei campioni testati con le metodiche ISO mentre nel 92.9% con la rPCR.

S. Enteritidis è stata riscontrata in 101 campioni positivi mentre in 43 campioni sono state isolate *Salmonelle* differenti. Un livello così alto di contaminazione da *S. Enteritidis* mostra come il patogeno sia persistente negli allevamenti turchi e indica la mancata attuazione o l'insufficiente rigidità delle norme di biosicurezza negli allevamenti che chiaramente influiscono sia sulla qualità che sul "rischio" del prodotto stesso.

8. *Salmonella* spp.: un problema di sanità pubblica

Salmonella spp. è la seconda fonte di zoonosi nel mondo preceduta soltanto da *Campylobacter* spp. In Europa nell'anno 2009 è stata responsabile di 108,614 casi attribuibili sia a contaminazioni alimentari che a casi di contatto con animali infetti. I casi di intossicazione alimentare sono primariamente da imputarsi al consumo di uova o di ovo-prodotti che rappresentano la fonte principale di contaminazione. Negli alimenti *Salmonella* spp. è stata anche isolata dalla carne fresca del pollame (polli e tacchini), e dei maiali ma con livelli medi molto inferiori rispetto ai valori di positività riscontrati nelle uova (EFSA, 2011). Per parlare dei casi di Salmonellosi umana la migliore fonte risulta essere l'EFSA che a livello europeo fornisce dati affidabili e completi, mentre a livello italiano è preferibile utilizzare i dati derivanti dall'Istituto Superiore di Sanità.

8.1. *Salmonella* spp. nell'uomo: dati relativi all'Italia

In Italia la salmonellosi umana è una patologia soggetta a notifica obbligatoria (D.M.15/12/90). Verranno quindi analizzati alcuni dati derivanti dal Rapporto ISTISAN 05/27 relativo agli anni 2000/2003, per poter avere una base di partenza ed un confronto, utili per analizzare gli ultimi dati disponibili relativi al triennio 2007-2009. È importante analizzare la mortalità di *Salmonella* spp. che in Italia fa registrare annualmente circa 20 decessi annui (ISTAT, 2005) il dato è tendenzialmente basso infatti i decessi risultano essere molto pochi ed in soggetti solitamente anziani.

Nel 2002 secondo i dati del bollettino del Ministero della Salute vi sono stati 406 focolai di tossinfezioni alimentari in Italia ma il dato non riporta gli agenti eziologici correlati e quindi non è possibile ricavare informazioni circa *Salmonella* spp.

Essendo *Salmonella* una patologia soggetta a notifica le ASL delle varie regioni sono quindi tenute a comunicare i casi di positività all'Istituto Superiore della Sanità (ISS) che in Italia è l'organo deputato al coordinamento del sistema Enter-net. Il sistema Enter-net è una risorsa europea, che raccoglie i dati di isolamento derivanti da 29 laboratori di microbiologia e fornisce dei dati, relativi alla situazione italiana, che vengono ritrasmessi alla comunità Europea dall'ISS. La rete Enter-net ha i seguenti obiettivi:

- ottenere dati circa gli isolamenti di *Salmonella* spp., *E.coli* produttori di verocitotossina e altri batteri enteropatogeni sul territorio Comunitario;
- descrivere la frequenza di sierotipi e sottotipi isolati;
- riconoscere tempestivamente eventi epidemici sul territorio;
- confrontare i dati del territorio italiano con quelli dei paesi europei che partecipano alla rete *Foodborne and Waterborne Disease and Zoonoses network* (FWD) dell'*European Center for Disease Prevention* (ECDC). La tabella 10 mostra i dati di isolamento dei sierotipi di *Salmonella* isolati nel periodo 2000/2003.

Tabella 10. Dati di isolamento dei sierotipi di *Salmonella* isolati nel periodo 2000/2003 in Italia(Enter-net, 2000/2003)

Sierotipo	2000	2001	2002	2003
S. Enteritidis	41,2	25,5	28,4	36,9
S. Typhimurium	31,0	44,6	46,3	39,6
S. Infantis	7,3	6,4	3,1	1,9
Altri	20,5	23,5	22,2	21,6
Totale	5966	5707	5074	6178

Il sierotipo più isolato nel 2000 è stato S.Enteritidis che ha fatto registrare una prevalenza del 41.2%, seguito da S.Typhimurium con il 31% di positività. Il dato più importante è però quello relativo al 2001 in cui S.Typhimurium supera nettamente gli isolati di S.Enteritidis e questo dato rimane poi costante negli anni e mostra una tendenza Italiana differente rispetto alla tendenza europea dove è S.Enteritidis il maggior sierotipo isolato.

Dati più recenti sono disponibili dal rapporto dell'attività svolta da Enter-net nel 2007-2009 (Enter-net, 2011) in tabella 11.

Tabella 11. Dati di isolamento di *Salmonella* spp. negli anni 2007-2009 suddivisi per regione (Enter-net, 2011)

Regione	Abitanti	n. ceppi 2007	n. Isolamenti/ per 100.000 abitanti	n. ceppi 2008	n. Isolamenti/ per 100.000 abitanti	n. ceppi 2009	n. Isolamenti/ per 100.000 abitanti
Abruzzo	1.339.241	5	0,4	24	1,8	-	-
Basilicata	588.662	6	1,0	-	-	-	-
Calabria	2.009.027	-	-	-	-	-	-
Campania	5.823.231	-	-	-	-	-	-
Emilia-Romagna	4.402.680	390	8,9	429	9,7	352	8,0
Friuli-Venezia Giulia	1.234.198	156	12,6	108	8,7	83	6,7
Lazio	5.690.444	356	6,2	404	7,1	454	8,0
Liguria	1.615.656	37	2,3	53	3,3	44	2,7
Lombardia	9.839.177	822	8,3	202	2,1	2.153	21,9
Marche	1.560.572	197	12,6	233	15,0	146	9,4
Molise	320.059	82	25,6	50	15,6	64	20,0
Piemonte	4.449.185	580	13,0	685	15,3	477	10,7
Puglia	4.084.526	189	4,6	50	1,2	97	2,3
Sardegna	1.672.511	-	-	37	2,2	62	3,7
Sicilia	5.043.083	-	-	65	1,3	1	-
Toscana	3.732.636	134	3,6	180	4,8	120	3,2
Trentino-Alto Adige	1.029.818	192	18,6	188	18,2	241	23,4
Umbria	902.138	238	26,4	265	29,4	198	21,9
Valle d'Aosta	127.871	-	-	21	16,4	25	19,5
Veneto	4.916.197	-	-	356	7,2	463	9,4
Totale	60.353.061	3.384	5,6	3.350	5,5	4.980	8,3

Dai dati riportati nella tabella 11 è possibile osservare come negli anni sia avvenuta una drastica riduzione delle positività da *Salmonella* spp. che è passata da circa 6000 casi di isolamento nel 2000 a circa 3500 nel biennio 2007/2008. E' però da sottolineare un aumento di casi nel 2009 (4980 casi). L'aumento del riscontro di positività per *Salmonella* spp. nel 2009 è dovuto in particolar modo alla regione Lombardia ed è la conseguenza diretta di un nuovo modello organizzativo per la sorveglianza e l'identificazione di nodi intermedi della rete, a livello delle 15 ASL lombarde. Questo meccanismo di analisi ulteriore è basato sull'introduzione di laboratori ospedalieri e laboratori di sanità pubblica che sono autorizzati ad effettuare isolamenti e tipizzazioni facendo poi riferimento alla propria ASL. La presenza quindi di più laboratori che hanno potuto effettuare le analisi ha permesso di analizzare in maniera più precisa i campioni portando ad un aumento della sensibilità delle analisi stesse. L'aumento percentuale degli isolamenti che passa da 5.5 isolamenti/100.000 abitanti nel 2007 a 8.3 isolamenti/100.000 abitanti nel 2009 è quindi dovuto all'aumento della sensibilità delle analisi lombarde ed influisce pesantemente sulla prevalenza. Il riscontro sembra quindi aumentare nel 2009 ma bisogna pensare al fatto che se queste analisi fossero state effettuate con la metodica del 2009, anche negli anni precedenti, anche i risultati di prevalenza degli anni precedenti sarebbero stati maggiori. La conseguenza di questo dato è che la tendenza degli isolamenti sia quella di decrescere percentualmente ma che la tendenza delle analisi sia quella di diventare più sensibili. È comunque

riscontrabile un buon miglioramento visto che nel 2003 venivano isolati 10.3 campioni positivi ogni 100.000 abitanti (ISS, 2005) mentre nel 2009 solo 8.3.

La tabella 12 mostra invece gli isolamenti relativi alla età della popolazione e permette di vedere come la fascia più colpita sia quella dei bambini di età inferiore ai sei anni che rappresenta circa il 40 % degli isolati.

Tabella 12. Infezioni da *Salmonella* spp. nel periodo 2007-2009 suddivisa per classi d'età (Enter-net, 2011)

Classe di età	Isolamenti 2007	%	Isolamenti 2008	%	Isolamenti 2009	%
0-11 mesi	81	2,5	85	3,0	169	3,9
1-5 anni	1.311	40,5	1.104	38,9	1.755	40,6
6-14 anni	616	19,0	465	16,4	734	17,0
15-64 anni	798	24,7	747	26,3	940	21,7
Oltre i 65 anni	428	13,2	433	15,3	722	16,9
Non noto/dato mancante	150	4,4	516	15,4	660	13,2
Totale	3.384		3.350		4.980	

Andando poi ad analizzare i sierotipi prevalenti, *S.Typhimurium* risulta essere il sierotipo più isolato in Italia con una prevalenza di circa il 40-45 % negli anni considerati, mentre si osserva la diminuzione di *S.Enteritidis* che passa dal 41% nel 2000 al 14.1% nel 2009. Tali dati potrebbero far pensare che le misure applicate dalla Comunità Europea stanno funzionando molto bene per *S.Enteritidis* ma non altrettanto bene per *S.Typhimurium* in Italia. Come mostrato in tabella 13.

Tabella 13. Sierotipi di *Salmonella* spp. isolati in Italia nel periodo 2007-2009 (Enter-net, 2011)

2007			2008			2009		
Sierotipo	n. ceppl	%	Sierotipo	n. ceppl	%	Sierotipo	n. ceppl	%
Typhimurium	1.475	44,0	Typhimurium	1.543	46,6	Typhimurium	1.972	40,1
Enteritidis	644	19,2	Enteritidis	606	18,3	4,5,12:i:-	825	16,8
4,5,12:i:-	159	4,7	4,5,12:i:-	248	7,5	Enteritidis	691	14,1
Derby	68	2,0	Derby	81	2,4	Napoli	153	3,2
Napoli	61	1,8	Infantis	78	2,3	Derby	136	2,8
Infantis	56	1,7	Napoli	53	1,6	Infantis	72	1,5
Hadar	32	0,9	Hadar	53	1,6	London	56	1,1
Thompson	28	0,8	Bredeney	38	1,1	Goldcoast	53	1,0
Brandenburg	26	0,8	Brandenburg	35	1,0	Bredeney	47	0,9
Bredeney	24	0,7	London	23	0,7	Hadar	41	0,8
Altri	400	12,0	Altri	519	15,7	Altri	698	14,2
Non disponibile	376	11,4	Non disponibile	32	1,2	Non disponibile	170	3,5
Totale	3.349	100,0	Totale	3.309	100,0	Totale	4.914	100,0

8.2 *Salmonella* spp. nell'uomo: dati relativi all'Europa

Come per i casi di Salmonelle negli allevamenti avicoli e più in generale negli alimenti anche per la salmonellosi umana il centro di riferimento a livello Europeo è l'*European Food Safety Authority* (EFSA) che annualmente stila un rapporto sugli andamenti della zoonosi nella Comunità Europea.

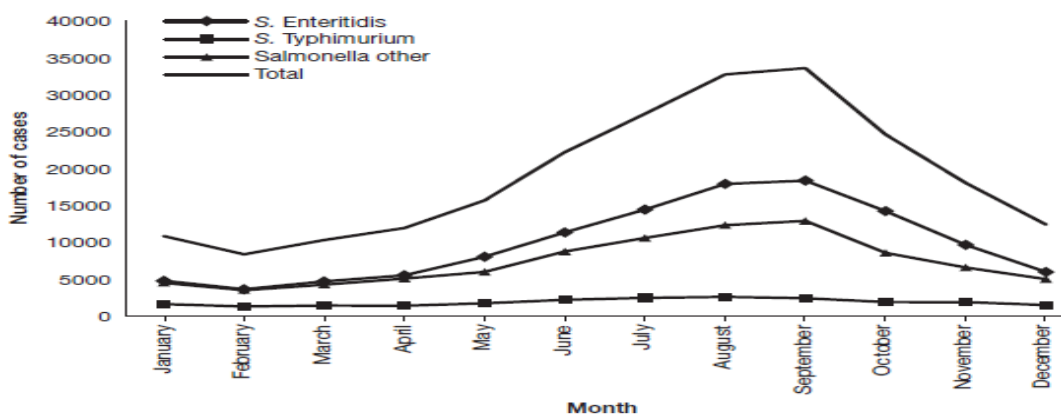
I dati che intendo trattare in questo paragrafo sono quelli derivanti da due rapporti dell'EFSA: *Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union* (EFSA, 2006) e *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks* (EFSA, 2011). In tabella 14 si possono osservare i trend di positività per *Salmonella* spp. negli anni 1999/2004 cui sono inclusi anche i dati della Norvegia. Nel 2004 tutti gli stati membri hanno riportato casi di Salmonellosi, eccezion fatta per il Lussemburgo che non ha fornito dati. Nel 2004 in Unione Europea 192.703 casi di infezione umana da *Salmonella* spp. sono stati confermati, un dato che mostra una prevalenza altissima di circa 42.2 casi ogni 100.000 abitanti. Questo risultato fuori dal comune, visto che dal 1999 al 2003 si era vista una decrescita negli isolamenti, è dovuto al fatto che fino al 2004 gli stati analizzati fossero 19. Nel 2004 si sono aggiunti la Repubblica Ceca, la Slovacchia, la Polonia, Malta, l'Ungheria e l'Estonia con un numero totale di 67.120 casi in più rispetto all'anno precedente.

Tabella 14. Positività per *Salmonella* spp. in UE negli anni 1999-2004 (EFSA, 2005)

	2004 Cases/ 100,000 population	2004	2003	2002	2001	2000	1999
		Number of cases					
Austria	89.5	7,286 (188)	8,251	8,322	7,219	7,017	7,058
Belgium	91.8	9,545	12,894	9,754	10,784	14,047	15,569
Cyprus	12.2	89	73	-	-	-	-
Czech Republic	300.9	30,724 (248)	-	-	-	-	-
Denmark	28.5	1,538	1,713	2,075	2,918	2,308	3,268
Estonia	10.0	135 (4)	-	-	-	-	-
Finland	43.1	2,248 (1788)	2,290	2,357	2,731	2,624	2,789
France	10.6	6,352	6,199	6,575	7,456	7,684	8,184
Germany	69.0	56,947 (1071)	63,044	72,377	77,386	79,535	85,146
Greece	13.5	1,493	837	460	284	206	221
Hungary	74.7	7,557	-	-	-	11,507	-
Ireland	10.2	410 (68)	449	369	430	640	956
Italy	11.6	6,696	6,352	10,744	8,215	5,765	7,943
Latvia	22.4	520 (6)	799	-	-	-	-
Lithuania	53.8	1,854	1,161	-	-	-	-
Luxembourg	-	-	421	528	319	-	353
Malta	19.8	79 (2)	-	-	-	-	-
Poland	41.8	15,958	-	-	-	-	-
Portugal	6.6	691	720	330	696	309	424
Slovakia	235.4	12,667 (43)	-	-	-	-	-
Slovenia	162.6	3,247	3,980	-	-	-	-
Spain ²	16.8	7,109	8,558	8,047	7,968	6,366	5,954
Sweden	39.7	3,562 (2709)	3,794	3,892	4,508	4,617	4,884
The Netherlands	9.4	1,520 (293)	2,142	1,588	2,082	2,059	2,128
United Kingdom	24.3	14,476 (248)	16,343	16,318	18,419	16,988	19,819
EU-Total	42.2	192,703	140,020	143,736	151,415	161,672	164,696
Norway	34.2	1,567 (1134)	1,539	1,495	1,899	1,489	-

Questo aumento del 22% dei casi di isolamento, è quindi un indice dell'aumento della positività della Comunità Europea, ma è un aumento dovuto alla maggior quantità di dati forniti. Infatti eliminando dal conteggio i casi attribuiti ai nuovi stati si riscontra una positività di circa 125.583 casi che segnano una forte decrescita rispetto agli anni precedenti. L'incidenza su 100.000 abitanti varia molto all'interno della Comunità, si possono notare valori molto bassi come quelli riscontrati in Portogallo (6.6/100.000 abitanti) e valori estremamente elevati (300.9/100.000 abitanti) come quelli osservati in Repubblica Ceca. La figura 14 mostra il rapporto di casi di infezione rispetto al mese dell'anno considerato.

Figura 14. Stagionalità di *Salmonella* spp. (EFSA, 2004)



Come si può notare la stagione della fine dell'estate/inizio autunno risulta essere colpita quella con maggiori casi di isolamento. In questa stagione si sviluppano circa il 34% delle infezioni totali annue, il dato si ripete con praticamente la stessa frequenza in ogni anno. La tabella 15 mostra il trend di riscontro negli isolati fra gli anni 2005-2009. Questa tabella fa parte di uno studio condotto dall'EFSA nel 2009 ed è in grado di mostrare come a partire dall'anno 2004 i valori di positività siano diminuiti considerevolmente fino a tornare nell'anno 2007/2008 alle medie precedenti all'inserimento dei nuovi paesi nelle statistiche (EFSA, 2011).

Tabella 15. Trend di positività di Salmonella spp. nell'uomo in U.E. negli anni 2005-2009 (EFSA, 2011)

Country	Report Type ¹	2009			2008	2007	2006	2005
		Cases	Confirmed Cases	Confirmed cases/ 100,000	Confirmed cases			
Austria ²	C	2,775	2,775	33.2	2,310	3,375	4,787	5,164
Belgium	C	3,113	3,113	29.2	3,831	3,973	3,693	4,916
Bulgaria ³	A	1,315	1,247	16.4	1,516	1,136	-	-
Cyprus	C	134	134	16.8	169	158	99	59
Czech Republic	C	10,670	10,480	100.1	10,707	17,655	24,186	32,860
Denmark	C	2,130	2,130	38.6	3,669	1,662	1,662	1,798
Estonia	C	261	261	19.5	647	430	453	312
Finland	C	2,329	2,329	43.7	3,126	2,737	2,574	2,478
France	C	7,153	7,153	11.1	7,186	5,510	6,008	5,877
Germany	C	31,395	31,395	38.3	42,909	55,400	52,575	52,245
Greece	C	409	403	3.6	1039	706	825	1,234
Hungary	C	6,029	5,873	58.2	6,637	6,578	9,389	7,820
Ireland	C	336	335	7.5	447	440	420	348
Italy	C	4,156	4,156	6.9	3,232	4,499	5,164	5,004
Latvia	C	816	795	35.2	1229	619	781	615
Lithuania	C	2,063	2,063	61.6	3,308	2,270	3,479	2,348
Luxembourg	C	162	162	32.8	202	163	308	211
Malta	C	124	124	30.0	161	85	63	66
Netherlands ⁴	C	1,205	1,205	11.4	1,627	1,245	1,667	1,388
Poland	A	8,964	8,521	22.3	9,149	11,155	12,502	15,048
Portugal	C	222	220	2.1	332	482	387	468
Romania ³	C	1115	1105	5.1	624	620	-	-
Slovakia	C	4,515	4,182	77.3	6,849	8,367	8,242	10,766
Slovenia	C	616	616	30.3	1,033	1,346	1,519	1,519
Spain ⁵	C	4,304	4,304	37.6	3,833	3,658	5,117	6,048
Sweden	C	3,054	3,054	33.0	4,185	3,930	4,056	3,168
United Kingdom	C	10,479	10,479	17.0	11,511	13,802	14,055	12,784
EU Total		109,844	108,614	23.7	131,468	152,001	164,011	174,544
Iceland	C	35	35	11.0	134	93	116	86
Liechtenstein	C	-	-	-	0	1	14	
Norway	C	1,235	1,235	25.7	1,941	1,649	1,813	1,482
Switzerland	C	1,325	1,325	17.2	2,051	1,802	1,798	1,877

Le positività calano considerevolmente negli anni, dal 2004 al 2009 si osserva una diminuzione di circa il 50% nei casi confermati. Infatti la positività del 2004 che si attestava a 42.2 casi ogni 100.00 abitanti finisce per scendere nel 2009 a 23.7 casi ogni 100.000 abitanti. Anche la Germania che negli anni 1999/2004 mostrava dei valori molto alti (79.535 casi nel 2000) sta riuscendo a diminuire fortemente le positività, ma rappresenta comunque un terzo del totale delle positività dell'U.E. La Repubblica Ceca è riuscita in sei anni come la Slovacchia a diminuire di circa due terzi le proprie positività. Tutti i paesi Europei tendono a mostrare una diminuzione delle positività, tranne Malta che continua a segnare una crescita nel numero dei casi riscontrati (da 79 casi nel 2004 a 124 nel 2009).

8.3. *Salmonella* spp. nell'uomo: dati relativi ai Paesi extraeuropei

Le malattie connesse al consumo di alimenti sono nel mondo fra i più seri problemi che affliggono la sanità pubblica (*World Health Organization*, 1984).

L'autorità che adotta e svolge le principali misure di sorveglianza e di prevenzione a livello mondiale nei confronti di *Salmonella* spp. è la *World Health Organization* (WHO), ed in particolare all'interno di questa, è il programma *Global Salm-Surv* ad analizzare i dati e a predisporre le misure di controllo da attuare per ridurre i rischi di infezione. Il Global Salm-Surv è una banca dati sul web che detiene le informazioni circa l'epidemiologia dei 15 sierotipi di *Salmonella* spp. più isolati nel mondo.

Lo studio che verrà riportato tratta una analisi della WHO, condotta fra gli anni 2000/2002. Il lavoro di sorveglianza ed epidemiologia è estremamente complesso e lungo. Infatti moltissimi paesi non forniscono dati completi o comparabili con gli altri in quanto non vengono intraprese misure di campionamento ed analisi standardizzate. Oltre a questo problema si pone il fatto che delle ricerche a livello mondiale siano difficili da eseguire in quanto i paesi da analizzare sono molti e presentano diversità culturali, alimentari e sanitarie difficilmente standardizzabili. Un altro problema fondamentale è rappresentato dalla mole di dati enorme che deve essere analizzata e validata. La tabella 14 mostra i risultati dello studio condotto.

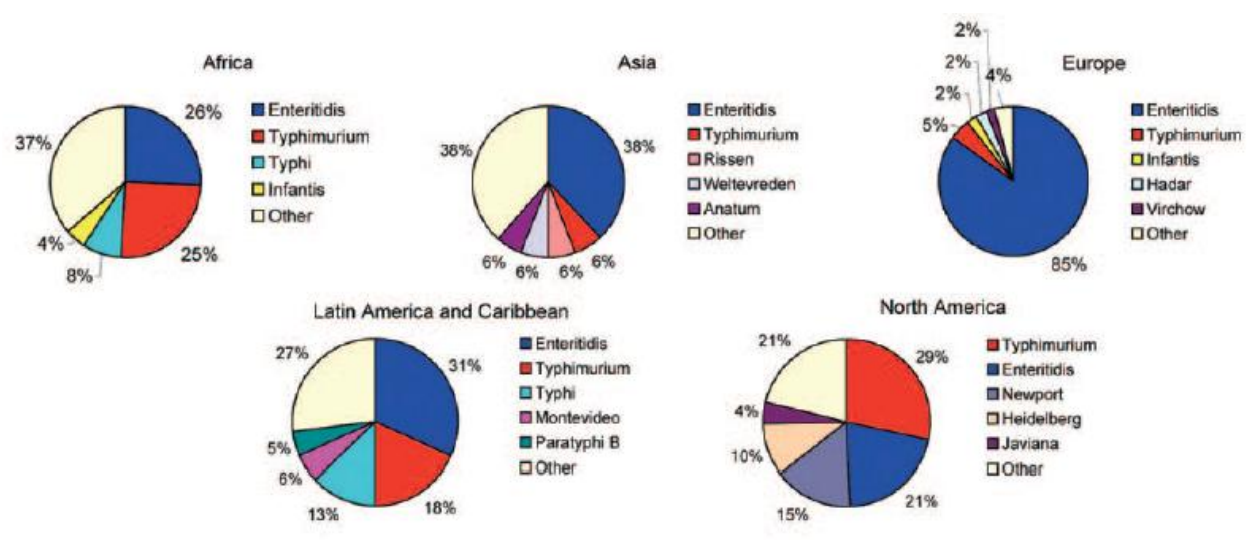
Quarantanove stati hanno partecipato alle analisi e hanno inviato dei dati al server della WHO fra il 2000 e il 2002. I dati derivavano da 376.856 isolati umani in tre anni, di questi l'87.9% era rappresentato da dati derivanti dal Nord America e dall'Europa. Nei tre anni 2000/2001/2002 gli isolati sono stati rispettivamente 137.329, 113.728 e 125.745 mostrando una tendenza a rimanere invariati. Nei tre anni considerati, il numero di isolamenti non è cambiato sostanzialmente, ma si può osservare come solo le regioni dell'Europa, dell'Oceania e dell'Asia siano riuscite a ridurre il numero di isolati. Si nota invece come il Nord America, abbia mantenuto negli anni la stessa prevalenza e come invece l'America latina e l'Africa abbiano invece aumentato le positività.

Tabella 16. Isolamento di *Salmonella* spp. nel mondo negli anni 2000-2002 (WHO, 2006)

Country	Human		
	2000	2001	2002
Africa	104	406	965
Cameroon		263	247
Mali			34
Morocco			76
Senegal	104	143	220
Tunisia			388
Asia	8,233	6,696	5,771
China			
Indonesia			
Japan	2,631	2,452	1,890
Korea	1,260	918	843
Malaysia	499		
New Caledonia		30	20
Philippines	606		
Thailand	3,233	3,279	2,922
Vietnam	4	17	96
Europe	91,788	73,556	85,385
Belgium	13,642	10,260	
Bulgaria	789	1,001	1,482
Cyprus			
Czech Republic	4,774	4,030	27,381
Denmark	2,063	2,632	1,844
Estonia			
Germany			
Greece			
Hungary	16,271	14,462	14,678
Israel	4,428	4,043	3,859
Latvia			
Luxembourg	381		
Norway	1,289	1,639	
Poland	38,138	26,601	28,705
Portugal	354	539	
Serbia and Montenegro	5,172	5,003	4,873
Slovakia			
Slovenia	3,456	1,576	2,563
Switzerland	1,031	1,770	
Latin America and Caribbean	2,054	2,239	2,491
Argentina	633	608	487
Barbados		27	71
Bolivia		19	9
Chile	929	920	1,284
Colombia	145	135	194
Costa Rica		49	
Cuba			65
El Salvador			149
Peru	115	120	49
Suriname			18
Trinidad		67	
Venezuela	232	294	165
North America	29,201	28,508	29,301
Canada	4,788	4,992	4,962
USA	24,413	23,516	24,339
Oceania	5,949	2,377	1,832
Australia	4,202		
New Zealand	1,747	2,377	1,832
Total countries	29	31	31
Total isolates serotyped	137,329	113,782	125,745

Il sierotipo più isolato in assoluto è stato *S. Enteritidis* che nel 2002 ha raggiunto il 65% degli isolati, seguito da *S. Typhimurium* con il 12% e da *S. Newport* (4%). Il ranking complessivo di isolamento è rimasto circa lo stesso durante tutti gli anni di isolamento. La figura 17 mostra i vari sierotipi isolati regione suddivisi per Continente. Al di fuori della Comunità europea il sierotipo *S. Enteritidis* non sempre risulta essere il sierotipo più isolato: in Nord America è *S. Typhimurium*. In Asia *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* si trovano esattamente allo stesso livello di presenza.

Figura 15. Sierotipi di Salmonella prevalenti nei differenti continenti (WHO, 2006)



9. Conclusioni

L'obiettivo della Comunità Europea è quello di fornire alimenti che siano sicuri e sani per il consumatore finale con un approccio "dal campo alla tavola". Per ottenere ciò è importante avere una maggior conoscenza dei rischi microbiologici e dei fattori ad essi associati e fonti normative che tutelino il cittadino.

Il presente lavoro di tesi ha analizzato la presenza di *Salmonella* spp. negli allevamenti di galline ovaiole e nell'uomo. Sono stati inoltre esaminati i principali sierotipi associati alle infezioni animali ed umane. Gli obiettivi erano quelli di: fornire una valutazione generale sullo stato sanitario dell'allevamento della gallina ovaiole e di valutare, dal punto di vista dell'efficacia, le misure che sono state intraprese dalla UE dal 2006 ad oggi per il controllo dei due sierotipi prevalenti di *Salmonella* (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*).

I risultati dell'analisi condotte sugli allevamenti di galline ovaiole Italiani ed Europei basati sulle informazioni raccolte dall'EFSA mostrano come dall'anno 2004 all'anno 2010 sia avvenuta una riduzione della prevalenza sia di *Salmonella* spp. che di *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*.

Osservando i dati relativi agli isolamenti di *Salmonella* spp. da campioni clinici umani, è possibile confermare l'ipotesi che ad una riduzione delle prevalenze negli animali è associata una riduzione delle prevalenze nell'uomo. La prevalenza nell'uomo è infatti diminuita nel giro del quinquennio 2004-2009 di circa il 50%. La riduzione complessiva delle infezioni da *Salmonella* spp., sia nei casi umani sia nei casi delle galline ovaiole, mostra come le misure intraprese dalla Comunità Europea si siano dimostrate vincenti nel controllo di tale microrganismo.

Il miglioramento e la corretta applicazione di misure igienico-sanitarie abbinate a piani di monitoraggio e misure di controllo sono gli strumenti che la Comunità Europea dovrà continuare ad utilizzare negli anni se vorrà fornire ai propri cittadini dei prodotti sani e sicuri.

Se da un lato il cosiddetto "rischio zero", cioè l'assenza del patogeno, non esiste ed è un'utopia, è importante, però, cercare di contenerlo mediante strategie a vasto raggio sulla sicurezza alimentare che richiedono l'adozione di norme moderne sugli alimenti e l'igiene, basate sui più avanzati dati scientifici.

10. Bibliografia

- Collier, S, A., Stockman, L, J., Hicks, L, A., Garrison, L, E., Zhou, F, J., Beach, M, J.,(2011). *Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water*. In Epidemiol. Infect (2012). Cambridge University Press 2012. pp.1-11.
- Dionisi, A, M., Filetici, E., Oczwarek, S., Arena, S., Benedetti, I., Lucarelli, C., Luzzi, I., Scavia, G., Minelli, F., Ciaravino, G., Marziano, M, L., Caprioli, A., (2011). Enter-net: Sorveglianza delle infezioni trasmesse da alimenti ed acqua. Rapporto dell'attività 2007-2009. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, volume 24, Roma, Registro Stampa Tribunale di Roma,31 gennaio 2011. pp.3-10.
- DIRETTIVA 88/166/CEE del Consiglio del 7 marzo 1988 relativa all'esecuzione della sentenza della Corte di giustizia nella causa 131/86 (annullamento della direttiva 86/113/CEE del Consiglio del 25 marzo 1986 che stabilisce le norme minime per la protezione delle galline ovaiole in batteria), Articolo 1. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L74 del 19 marzo 1988.
- DIRETTIVA 2003/99/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio, Articolo 1. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L325 del 12 dicembre 2003.
- DIRETTIVA 1999/74/CE DEL CONSIGLIO del 19 luglio 1999 che stabilisce le norme minime per la protezione delle galline ovaiole, Articolo 2,3,4,5. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L203 del 3 agosto 1999.
- DIRETTIVA 1992/117/CEE DEL CONSIGLIO del 17 dicembre 1992 riguardante le misure di protezione dalle zoonosi specifiche e la lotta contro agenti zoonotici specifici negli animali e nei prodotti di origine animale allo scopo di evitare focolai di infezioni e intossicazioni

alimentari, Articolo 3,5. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L62 del 15 marzo 1993.

- Dwight, L, S, (1994). *General informations and fundamentals of disease prevention*. In Poultry health handbook 4th edition (1994). Pennsylvania state university. pp.5-14.
- EFSA (2007). *Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus*. In: The EFSA Journal (2007). pp.7-10/12-42.
- EFSA, ECDC (2012). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010*. In: The EFSA Journal (2012). pp.22-27/52-82
- EFSA (2006). *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004*. In: The EFSA Journal (2006). pp.23-26/42-52.
- EFSA, ECDC (2011). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009*. In The EFSA Journal (2011). pp.22-28/55-85.
- EFSA (2012). *European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010*. In: The EFSA Journal (2012). pp.22-27/52-82.
- EFSA, Panel on Biological Hazards (2011). *Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in broilers*. In The EFSA Journal (2011). pp.7-9.
- Galanis, E., Danilo M, A., Wong, L, F., Patrick, M, E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara, K, A., Ellis, A., Angulo, F, J., Wegener, H C., (2006). *Web-based Surveillance and*

Global Salmonella Distribution, 2000–2002. In *Emerging Infectious Diseases*, Available at: www.cdc.gov/eid. Vol. 12, No. 3, March 2006. pp.381-388.

- Graziani, C., Galetta, P., Busani, L., Dionisi, A, M., Filetici, E., Ricci, A., Caprioli, A., Luzzi, I., (2005). Le infezioni da *Salmonella* spp.: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. Rapporti ISTISAN (2005). Roma. pp.1-32.
- International Standard ISO: 6579/2002.
- Merluzzi, M, (2008). Allevamento della gallina ovaioia. In: Cavani, C., Cerolini, S., Marzoni Fecia di Cossato, M., Romboli, I., Merluzzi, M., *Avicoltura e conigliicoltura 1ª edizione* (2008). Milano, Le Point Vètèrinaire Srl. pp.298-327.
- Ministero della Salute (2012). Piano nazionale di controllo di *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium, nelle galline ovaiole della specie *Gallus gallus* anno 2012. Approvato con Decisione 2011/807/UE.
- NAHMS, CDC, (1999). *Distribution of Salmonella Prevalence in Hens and Eggs*. In *National Animal Health Monitoring System*. Part I: Reference of 1999 table egg layer management in the U.S. (Annex B) 1999. Available at: www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Poultry/Lay99del.pdf.1999. pp.2-13.
- Pascucci, S. (2005). Tecniche di allevamento e patologia del pollo e del tacchino presso l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Lezione tenuta al 13° Corso di formazione specialistica in tecnica dell'allevamento avicolo e patologia aviaria. Brescia, 12 aprile 2005. pp.9-13.
- Pascucci, S, (2001). Salmonelle: tassonomia, patogenesi e immunità. Atti della Giornata di Studio su Salmonellosi aviaria e riflessi zoonosici Applicazione dei Piani di controllo D.M. 339/2000. Regione Lombardia, (2003). pp.7-14.

- Poppe, C., (2000). *Salmonella Infections in the Domestic Fowl*. In *Salmonella in Domestic animals* (2000). New York, CABI publishing. pp.107-132.
- REGOLAMENTO (CE) N. 589/2008 DELLA COMMISSIONE del 23 giugno 2008, recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1234 /2007 del Consiglio per quanto riguarda le norme di commercializzazione applicabili alle uova, Articolo 2. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L136 del 24 giugno 2008.
- REGOLAMENTO (CE) N. 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali, Articolo 1. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L165 del 30 aprile 2004.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1237/2007 DELLA COMMISSIONE del 23 ottobre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio e la decisione 2006/696/CE per quanto concerne l'immissione in commercio di uova provenienti da branchi di galline ovaiole contaminati da salmonella, Articoli 1,2,3,4. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L280 del 24 ottobre 2007.
- REGOLAMENTO (CE) N. 183/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 12 gennaio 2005, che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi,Articolo 1. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L35 dell'8 febbraio 2005.
- REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari, Articolo 1. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L139 del 30 aprile 2004.
- REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, Articolo 3. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L139 del 30 Aprile 2004.

- REGOLAMENTO (CE) N. 1774/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 3 ottobre 2002, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano, Articolo 4. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L273 del 10 ottobre 2002.
- REGOLAMENTO (CE) n. 1069/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 21 ottobre 2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale), Articolo 10. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L300 del 14 novembre 2009.
- REGOLAMENTO (CE) N. 2160/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 novembre 2003, sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti, Articoli 3,4. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L325 del 12 dicembre 2003.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1177/2006 DELLA COMMISSIONE del 1° agosto 2006, che applica il regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni per l'impiego di metodi di controllo specifici nel quadro dei programmi nazionali per il controllo della salmonella nel pollame, Articoli 2,3. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L212 del 2 agosto 2006.
- REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE, del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, Articolo 1. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L338 del 22 dicembre 2005.
- REGOLAMENTO (UE) N. 517/2011 DELLA COMMISSIONE del 25 maggio 2011, recante disposizione di attuazione del regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda un obiettivo dell'Unione per la riduzione della prevalenza di determinati sierotipi di *Salmonella* nelle ovaiole di *Gallus gallus* e che modifica il regolamento (CE) n. 2160/2003 e il regolamento (UE) n. 200/2010 della Commissione, Articolo 1. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L138 del 26 maggio 2011.

- REGOLAMENTO (CE) N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, Articoli 1,5. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L31 del 1° aprile 2002.
- Scavia, G., Busani, L., Caprioli, A., Dionisi, A. M., Escher, M., Galati, F., Graziani, C., Luzzi, I., (2012). La sorveglianza delle malattie trasmesse da alimenti in Europa e in Italia. VIII Workshop Nazionale Enter-net Italia. Riassunti, Vietri sul Mare, Salerno, 31 maggio-1 giugno (2012). pp.1-7.
- Shivaprasad, H. L., (2003). *Pullorum Disease and Fowl Typhoid in Bacterial Disease* cpt.16. In Saif, Y. M. Diseases of poultry, 11th edition (2003). Ames, Iowa State Press A Blackwell Publishing Company. pp.568-572.
- Temelli, S., Kahya, S., Eyigor, A., Carli, K. T., (2010) *Incidence of Salmonella Enteritidis in chicken layer flocks in Turkey: Results by real-time polymerase chain reaction and International Organization for Standardization culture methods*. In Poultry Science (2010). pp.1406-2010.
- Wales, A. D., Davies, R. H., (2011). *A critical review of Salmonella Typhimurium infection in laying hens*. In Avian Pathology (2011). Published in associations with the WVPA. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2011.606799>. pp.429-436.
- World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations., (2002). *Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens: Interpretative summary. Microbiological risk assessment* (2002). Geneve, Publication of the World Health Organization. pp.7-11.
- Zavanella, M., (2001). *Tipizzare le Salmonelle* (2001). Brescia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche. pp.9-72.